

**UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON
CANNABISINHALTSSTOFFEN IM URIN
MITTELS DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE**

HELMUT HEFELE

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München
Vorstand Prof. Dr. med. W. Spann

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON CANNABISINHALTSSTOFFEN IM URIN
MITTELS DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
HELMUT HEFELE

aus
Kolbermoor

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. L. von Meyer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Spann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.1987

Für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Rechtsmedizin
danke ich besonders Herrn Prof. Dr. med. W. Spann.

Für die Überlassung des Dissertationsthemas, die große
Hilfsbereitschaft und die hervorragende Betreuung möchte ich
Herrn Priv.-Doz. Dr. L. von Meyer meinen herzlichsten Dank
ausdrücken.

Meiner Mutter gewidmet

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON CANNABISINHALTSSTOFFEN IM URIN MITTELS DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	- 1 -
1.1.	Struktur und Metabolismus des Delta-9-Tetrahydrocannabinol	- 2 -
1.2.	Nicht-dünnschichtchromatographische Nachweis-Verfahren für Cannabisderivate im biologischen Material in der Literatur	- 5 -
1.3.	Dünnschichtchromatographische Verfahren in der Literatur unter besonderer Berücksichtigung der neuen Verfahren mit Festphasenextraktion	- 8 -
2.	Aufgabenstellung	- 15 -
2.1.	Untersuchung der vorhandenen Verfahren	- 15 -
2.2.	Entwicklung eines eigenen Verfahrens	- 15 -
3.	Untersuchungsmaterial, Materialien und Methode	- 17 -
3.1.	Untersuchungsmaterial	- 17 -
3.2.	Materialien	- 17 -
3.3.	Methoden	- 18 -
4.	Eigene Untersuchungen	- 19 -
4.1.	Untersuchung der in der Literatur beschriebenen Verfahren	- 19 -
4.2.	Erarbeitung eines eigenen Verfahrens	- 29 -
5.	Untersuchungsergebnisse	- 37 -
5.1.	Vergleichende Untersuchung der in der Literatur beschriebenen Verfahren	- 37 -
5.2.	Vergleichende Untersuchung der bei den überprüften Verfahren angegebenen Fließmittel	- 44 -
5.3.	Vergleichende Untersuchung des selbst entwickelten Verfahrens mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren	- 48 -

5.4.	Bewertung des neu entwickelten Verfahrens im Vergleich zu einem nicht-dünnschichtchromatographischen Verfahren.	- 51 -
6.	Diskussion	- 53 -
7.	Zusammenfassung	- 56 -
8.	Anhang	- 58 -
8.1.	Arbeitsvorschriften	- 58 -
8.2.	Abbildungen	- 78 -
9.	Literaturverzeichnis	- 87 -
10.	Lebenslauf	- 92 -

1. EINLEITUNG

Haschisch und Marihuana sind die zwei bekanntesten unter Dutzenden von anderen Bezeichnungen für ein Rauschmittel, das aus der Verarbeitung der Hanfpflanze gewonnen wird. Die Hanfpflanze, *Cannabis sativa* var. *indica*, wird in vielen Formen fast auf der ganzen Welt angebaut. Sie benötigt jedoch, um einen hohen Gehalt an Cannabinolen, den berauschenden Wirkstoffen, auszubilden, eine hohe mittlere Tagestemperatur. Die Pflanze wird zwar auch in Mitteleuropa angebaut, erreicht aber aus oben erwähnten Gründen nicht die Rauschwirkung der aus dem Vorderen Orient, Indischen Subkontinent oder Mittel- und Südamerika eingeführten Sorten, die größtenteils als gepreßte Platten (Haschisch) oder als tabakartiges Gemisch aus den getrockneten Blättern und Blüten der weiblichen Exemplare (Marihuana) auf den Drogenmarkt kommen. Der Anbau, Handel und Besitz aller Formen von *Cannabis* fällt unter das Betäubungsmittelgesetz und ist somit strafbar und illegal. Nach dem Alkohol ist *Cannabis* die am weitesten und meist verbreitete " Rauschdroge " auf der ganzen Erde.

Das aus kleinen Drüsenköpfchen der oberen Laubblätter austretende Harz ist für die berauschende Wirkung verantwortlich. Aus diesem Harz wurden bereits mehr als 100 Inhaltsstoffe identifiziert, wobei das Delta-9-Tetrahydrocannabinol, im Folgenden kurz THC genannt, als die Substanz mit der größten psychotropen Potenz angesehen wird (14). Je nach Anbaugebiet und Aufarbeitung schwankt der Gehalt an THC zwischen 0,5 - 2,0 % (Marihuana), 5,0 - 15 % (Haschisch), bis zu 60 % (Haschischöl) und somit auch die halluzinoge Wirkung (39). Daneben spielt auch die Applikation eine wesentliche Rolle in Bezug auf Stärke und Dauer des Rausches. Gewöhnlich wird Haschisch als Joint oder in einer Wasserpfeife geraucht, aber auch die orale Aufnahme in Form eines Tees, als Backware oder pur

wird beschrieben. Die Inhalation hat einen schnellen Anstieg von THC im Körper und ein Wirkungsmaximum 15 Minuten nach Beendigung des Rauchens zur Folge, wobei die Wirkung nach ca. 1 Stunde kontinuierlich nachläßt und nach 3 Stunden vorüber ist. Bei der oralen Aufnahme hingegen tritt je nach Magen- und Darminhalt die Wirkung später ein, hält allerdings wesentlich länger an.

Die ersten Versuche zur Identifikation von Haschischbestandteilen aus dem Urin durch Dünnschichtchromatographie datieren aus der Zeit der ersten großen Rauschgiftwelle in der zweiten Hälfte der Sechziger Jahre. Die relativ unspezifischen Verfahren nach dem klassischen Ausschüttelungsprinzip ermangelten der für die im Urin in äußerst geringen Mengen vorhandenen Substanzen nötigen Empfindlichkeit, sowie ihrer erforderlichen Reproduzierbarkeit. Erst die Einführung der substanzspezifischen Extraktion mit Festphasenstoffen, sogenannten Austauschharzen, zu Beginn der Achtziger Jahre erbrachte die notwendige hohe Empfindlichkeit, die aus toxikologisch-forensischer Sicht geboten scheint.

Die Nachweisbarkeit von Haschisch im Urin hat eine wichtige forensische Bedeutung, insbesondere in Bezug auf Rauschgiftkriminalität. Auch Delikte im Straßenverkehr werden unter Einfluß von Haschisch begangen, wobei sich der Vergleich mit alkoholisierten Verkehrsteilnehmern aufdrängt. Schließlich dient die Nachweisbarkeit von Haschisch auch der Therapiekontrolle bei Rauschgiftentwöhnung in Drogenkliniken.

1.1. Struktur und Metabolismus des Delta-9-Tetrahydrocannabinol

Die im Haschisch enthaltenen pharmakologisch-toxikologisch wirksamen Inhaltsstoffe werden als Cannabinoide bezeichnet.

net. Von den bisher über 50 strukturell identifizierten Cannabinoiden sind neben ihren Metaboliten und Hydrolyseprodukten folgende drei am bedeutsamsten: das als Halluzinogen wirksamste Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC), das antibiotisch wirksame Cannbidiol (CBD) und das unwirksame Cannbinol (CBN) (4). (Abb. 1)

Die Nomenklatur des THC ist in der Literatur nicht einheitlich. Je nach Zählweise der C-Atome bezeichnet man das THC als Delta-1-Tetrahydrocannabinol (Monoterpenstruktur), wobei man am C-Atom mit der Methylseitenkette zu zählen beginnt, oder als Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Dibenzopyranstruktur), wobei man am C-Atom des Phenolringes mit der OH-Gruppe zu zählen beginnt. In der überwiegenden Zahl der Veröffentlichungen zu THC wird die Bezeichnung Delta-9-THC bevorzugt, ebenso bei der hier vorliegenden Untersuchung. Auch nach der Genfer Nomenklatur (JUPAC) ist von der Bezeichnung Delta-9-THC auszugehen (Abb. 2).

Die Identifizierung des THC als psychotrope Substanz sowie die Aufklärung der chemischen Struktur des THC wurden von GAONI et al. (12) und MECHOULAM (33) beschrieben. Dies wiederum ermöglichte erst die vielfältigen Untersuchungen zum Metabolismus des THC.

LEMBERGER et al. (31) untersuchten im Jahre 1971 mit Hilfe von radioaktiv markiertem, synthetisch hergestelltem THC Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung des Stoffes im menschlichen Organismus. Sie fanden, daß der Gehalt an unverändertem THC im Plasma in den ersten drei Stunden nach Inkorporation als Folge erneuter Umverteilung und Aufnahme ins Gewebe rasch absinkt, aber in den folgenden drei Tagen noch nachweisbar bleibt. HOLLISSER et al (17)

berichten, daß mit dem Urin nur etwa 0,01 - 0,005 % einer Einzeldosis von THC unverändert ausgeschieden werden, AGURELL et al. (2) fanden im Urin und Kot ähnlich geringe Mengen an unverändertem THC, JOACHIMOGLU et al. (19) nichts dergleichen.

Untersuchungen von MACHATA (32) ergaben, daß nach inhalativer Aufnahme von 10 mg THC die Plasmakonzentration innerhalb von 2 Stunden auf 5 ng/ml absinkt.

Die geringen Mengen von unverändertem THC im Plasma und damit die minimale Ausscheidungsrate der Substanz sind auf die rasch einsetzende Verteilung und den schnellen Metabolismus zurückzuführen, welcher bei inhalativer Aufnahme bereits im Lungengewebe, bei oraler Aufnahme nach der portalen Passage vorwiegend in der Leber beginnt. Aufgrund seines hochlipophilen Charakters wird THC schnell ins Fettgewebe aufgenommen und dort gespeichert. Der Zweck des Metabolismus besteht darin, die Substanz ausscheidbar zu machen. Durch die Einführung von Hydroxyl- und Carboxylgruppen erhöht sich die Polarität und Wasserlöslichkeit des Moleküls. Ausgehend vom unpolaren THC werden durch Hydroxilierung u.a. hauptsächlich folgende, mehr polare, Moleküle gebildet: 8-alpha-Hydroxy-delta-9-THC, 8-beta-Hydroxy-delta-9-THC, 8,11-Dihydroxy-delta-9-THC sowie 11-Hydroxy-delta-9-THC (42) (Abb. 3). Der Ersatz der Hydroxyl-Gruppe am letztgenannten Molekül durch eine COOH-Gruppe führt zur Ausbildung der 11-nor-delta-9-Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure (THC-COOH) als Hauptmetaboliten (Abb. 1). Die Paarung der THC-COOH mit Glucuronsäure zu einer Esterverbindung ermöglicht schließlich die renale Ausscheidung (Abb. 4). Der Vorgang der Ausscheidung dauert bei einmaliger Aufnahme von THC einige Tage, bei häufigerer Aufnahme kann es auf Grund der Kumulierung 3-4 Wochen dauern, bis alles THC aus dem Körper entfernt ist (29).

1.2. Nicht-dünnschichtchromatographische Nachweisverfahren für Cannabisderivate im biologischen Material in der Literatur

Eine Reihe verschiedenster nicht-dünnschichtchromatographischer Nachweisverfahren zur Identifikation und Detektion von THC bzw. THC-COOH wird in der Literatur beschrieben. Die Arbeiten dazu wurden nach der Entdeckung des THC als der psychotropen Substanz im Haschisch vor ca. 20 Jahren so umfangreich und vielfältig durchgeführt, daß das THC heute als eine der am besten untersuchten Suchtstoffe gilt. Verwendung fanden dabei fast alle bekannten Untersuchungsmethoden sowie verschiedene Kombinationen derselben, mit dem Ziel, ausschließlich THC oder einen einzigen Metaboliten zu isolieren. Aufgrund der überaus zahlreichen Veröffentlichungen kann die nachstehende Aufstellung keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben. Es seien die wichtigsten Verfahren erwähnt, im übrigen wird auf die einschlägige Literatur verwiesen.

Radioimmunoassay (RIA)

Der erste Einsatz eines RIA-Tests für Cannabinoide durch TEALE et al. 1974 (40) ermöglichte auf Grund geringen apparativen Aufwandes und niedriger Kosten fortan die Untersuchung biologischen Materials in größerem Umfang. Die für den RIA-Test benötigten Antisera wurden von Schafen gewonnen, denen THC intramuskulär gespritzt wurde. Der Nachteil der Methode besteht darin, daß die Antikörper im Testserum eine etwa gleiche Bindungsaffinität gegenüber Cannabinoiden mit geschlossenen 3-Ringsystemen besitzen, somit also nicht für einen einzigen THC-Metaboliten spezifisch sind. Die Empfindlichkeit gegenüber nicht geschlossenen 3-Ringsystemen ist gering oder nicht meßbar (18).

Enzymimmunoassay (EMIT)

EMIT ist die Abkürzung für " Enzyme multiplied immunoassay technique " und ein eingetragenes Warenzeichen der SYVA Comp., Palo Alto, CA, USA (38). Das EMIT-Verfahren wurde, nachdem es bereits zum Nachweis von Opiaten, Amphetaminen und Cocain gute Dienste erwies, im Jahre 1980 um einen enzymimmunologischen Test für Cannabinoide erweitert. Gemessen wird dabei die Extinktionsänderung des cannabinoidehaltigen Urins nach Zugabe eines Substrats und Malatdehydrogenase-THC-Carbonsäure-Komplexes zusammen mit einem Antikörper. Dieser Antikörper reagiert am empfindlichsten auf THC-COOH, aber auch auf THC, THC-Metaboliten, sowie Cannabinol und Cannabidiol. Das Verfahren ist, wie auch der RIA, nicht substanzspezifisch, sodaß falschpositive Ergebnisse nicht immer ausgeschlossen werden können (30). Es eignet sich aber als schnelle Screening-Methode, zumal der Urin in keiner Weise aufgearbeitet werden muß.

Gaschromatographie (GC)

Das Verfahren der Gaschromatographie zur Identifikation von Cannabinoiden im biologischen Material fand wegen ihrer Empfindlichkeit und Trennleistung bald breite Anwendung, allerdings meist in Kombination mit anderen Methoden. BACHMANN et al. (5) beschreiben ein GC-Verfahren, um THC im Plasma nachzuweisen, WHITING et al. (43) wiesen einen THC-Metaboliten im Urin mit GC nach. Aufgrund ihres Aufwandes kann das GC-Verfahren der genannten Autoren nur in ausgewählten Fällen Anwendung finden, nicht jedoch im Routinebetrieb. Ebenso verhält es sich mit dem GC-Verfahren in Kombination mit einem nachgeschalteten Verfahren, z.B. Massenspektrometrie (MS).

Kombinierte Verfahren mit Gaschromatographie

Die Anwendung von Gaschromatographie, kombiniert mit anderen Verfahren, findet in der Literatur breiten Nieder-

schlag. Insbesondere die Kombination Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS-Verfahren) ist in der Lage, die Identifikation unbekannter Verbindungen zu ermöglichen (8, 11, 16, 44). Darüber hinaus bietet das GC/MS-Verfahren die Möglichkeit, auch quantitativ die Menge an THC in einer definierten Menge Urin oder Plasma zu bestimmen (1, 11). Die quantitative Bestimmung wird nur dann sinnvoll zum Einsatz kommen, wenn dem Haschischkonsumenten unter den objektiv klinischen Zeichen eines Haschischrausches Venenblut entnommen wird.

ELSOHLY et al. (9) entwickelten ein Verfahren, indem sie die GC mit der Electron Capture Detection (ECD)-Methode kombinierten. Nach der Hydrolyse des zu untersuchenden cannabishaltigen Urins wird ausschließlich die THC-Carbonsäure (THC-COOH) gemessen.

High_Performance_Liquid_Chromatography_(HPLC_)

Beim HPLC-Verfahren werden die zu bestimmenden Substanzen durch hohe Drücke getrennt und anschließend über Absorption gemessen. Zur Identifikation von THC und THC-Metaboliten wird das HPLC-Verfahren erst seit allerneuester Zeit angewandt. ELSOHLY et al. (10) erfassen dabei vorwiegend die THC-Carbonsäure. Die dazu angegebene Vorschrift zur Aufbereitung des Urins und Gewinnung der gesuchten Substanz kann ohne weiteres auf die Dünnschichtchromatographie angewandt werden. (Dies wurde auch in den durchgeführten eigenen Untersuchungen mit DC getan). Ein weiteres HPLC-Verfahren wird von PEAT et al. (35) angegeben.

1.3. Dünnschichtchromatographische Verfahren in der Literatur unter besonderer Berücksichtigung der neuen Verfahren mit Festphasenextraktion

Erste Versuche, THC oder THC-Metaboliten aus biologischem Material zu extrahieren und über Dünnschichtchromatographie (DC) darzustellen, wurden zu Ende der Sechziger Jahre unternommen.

Die zu dieser und in der Folgezeit entwickelten Verfahren hatten, das eine mehr, das andere weniger, im Vergleich zu den heutigen modernen Verfahren mit Festphasenextraktion eine ganze Reihe von Nachteilen.

1. In Unkenntnis des Metabolismus des THC wurde versucht, das, wenn überhaupt, in Spuren vorkommende THC aus dem Urin zu isolieren.
2. Die sichere Detektion von Cannabisinhaltsstoffen im Urin war an die Aufnahme hoher Dosen von Cannabis gebunden. Das bedeutet wiederum, daß die Empfindlichkeit weit jenseits heutiger Ansprüche liegt.
3. Aus 2. folgt, daß dazu auch große Urinmengen nötig waren. Die schwankende Harnkonzentration wurde dadurch kompensiert, daß die zu untersuchende Urinmenge einen bestimmten Gehalt an Kreatinin haben mußte.
4. Die klassische Methode der Flüssig - Flüssig - Extraktion enthielt in der Etherphase neben THC auch noch andere Cannabinoide wie Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD) und Cannabidiolsäure (CBDS) sowie andere Begleitstoffe aus dem Urin.
5. Aufgrund der Vielzahl der extrahierten Stoffe konnte kein einheitliches Fleckmuster auf der DC-Platte gefunden werden, zumal auch mitextrahierte nicht-cannabinoide Begleitstoffe das Fleckmuster mehr oder weniger stark störten.
6. Die Aufreinigung der Extrakte gelang teilweise nicht gut, sodaß die typischen Fleckmuster wegen der Harnfarbstoffe nicht oder nur schwierig auszumachen waren.

MACHATA et al. (32) (1970) führten einen dünnschichtchromatographischen Versuch des Nachweises von Cannabinoiden im Urin durch, wobei Versuchspersonen Haschisch zu sich nahmen, die Urinproben gesammelt und die Extrakte entsprechend dünnschichtchromatographisch dargestellt wurden. Bei zwei von vier durchgeführten Versuchen, bei denen 1,5 g Haschisch verkonsumiert wurden, konnten im 2-Stunden-Urin Cannabinol, Cannabidiol und Tetrahydrocannabinol deutlich nachgewiesen werden, im 8-Stunden-Urin lediglich noch in Spuren. Die Autoren konnten zeigen, daß, wenn auch nach Einnahme vergleichsweise hoher Haschischdosen, ein Nachweis verschiedener Haschischbestandteile im Urin möglich ist.

Mit Hilfe der Dansylierung, der Umsetzung der phenolischen Hydroxy-Gruppen des THC zu den entsprechenden Sulfonsäureestern, konnten JUST et al. (20) (1972) nach Entwicklung auf der Dünnschichtplatte die Substanz im UV-Licht (350nm) als grün-gelb fluoreszierenden Fleck darstellen und direkt fluorometrisch messen. Die Nachweisgrenze lag dabei im Bereich von $1 \cdot 10^{-12}$ Mol DANS-THC. Die Versuche wurden mit 200 mg Haschisch durchgeführt, also einer mittleren Dosis. Die Untersuchungen wurden mit jeweils 40 ml Urin vorgenommen, wobei der 6-Stunden-Urin das zeitliche Limit bedeutete, an dem noch Haschischbestandteile erfaßt wurden.

KISSER (27) (1972) untersuchte in einem Zeitraum von 2 Jahren mehr als 40 Harnproben auf Cannabinoide, ohne Kenntnis davon zu haben, ob und zu welchem Zeitpunkt eine Haschischaufnahme stattgefunden hat. Lediglich in zwei Fällen gelang dem Autor ein eindeutiger Nachweis, in einem dieser Fälle deuteten klinische Symptome (Bewußtlosigkeit) auf eine " Überdosis " hin. Die dabei eingesetzten Urinmengen betrugen 150 bzw. 250 ml.

Ähnlich pessimistisch beurteilten SALASCHEK et al. (37) (1973) ihre umfangreichen dünnschichtchromato-

graphischen Urinuntersuchungen zum Nachweis von Haschischgenuß. Die von Versuchspersonen sowie von Drogenabhängigen gewonnenen Urinproben wurden verschiedenartig hydrolysiert, extrahiert und chromatographisch getrennt, ein spezifisches Fleckmuster, welches mit Sicherheit die Anwesenheit von Cannabinoiden im Urin erwiesen hätte, konnte nicht ermittelt werden.

Eine Reihe weiterer Verfahren zur Isolierung von Cannabisstoffen aus biologischem Material wurde von den Autoren KANTER und HOLLISTER von Veterans Administration Hospital, Palo Alto, California in den Jahren 1974 und 1975 angegeben. KANTER, HOLLISTER et al. (24) fanden nach oraler Gabe von Cannabis im Urin eine Substanz, die verschieden von bisher bekannten Hydroxy- oder Dihydroxy-Metaboliten des Delta-9-THC war. Diese unbekannte Substanz hatte ein Molekulargewicht von 312, im Gegensatz zu THC (Molekulargewicht 314) und THC-COOH (Molekulargewicht 344), und wurde über mehr als 36 Stunden ausgeschieden. Ein detailliertes Verfahren zu Extraktion und DC wird beschrieben.

Das gleiche Verfahren findet bei einer weiteren Veröffentlichung von HOLLISTER, KANTER et al. (17) Anwendung. Je vier Personen wurde peroral bzw. intravenös THC verabreicht. Die teilweise stündlich gewonnenen Urinproben ergaben, daß nur in den ersten sechs Stunden unverändertes THC nachweisbar war, und hier wiederum in einer Größenordnung von nur 0,005 - 0,01 % der verabreichten Dosis. Die Autoren sprechen die Vermutung aus, daß THC im menschlichen Organismus schnell und annähernd vollständig metabolisiert wird.

Die Erkenntnis, daß THC nur kurzzeitig und in geringsten Mengen ausgeschieden wird, ansonsten aber metabolisiert wird, führte nun dazu, daß KANTER, HOLLISTER et al. (23) ihre bisherige Extraktionsmethode dahingehend er-

weiterten, daß sie nach der üblichen Extraktion mit Hexan die nun auf einen pH von 12 eingestellte wässrige Phase nochmals mit Ether ausschüttelten. Die Etherphase enthielt nun die " neutrale " Fraktion. Die dabei übrig gebliebene wässrige Phase wurde auf einen pH von 2,5 eingestellt und nochmals ausgeschüttelt, und zwar mit Diethylether bzw. mit Ether. Somit ergab sich eine schwach bzw. stark saure Fraktion. Gegenüber der neutralen Fraktion zeigten die Substanzen aus der schwach sauren Fraktion auf dem Chromatogramm eine größere Persistenz und Intensität sowie eine bessere chromatographische Trennung. Die stark saure Fraktion beinhalten eine Menge an nicht-cannabinoiden Begleitstoffen, die die Zuordnung der Chromatogrammflecke erschwerten.

In einer weiteren Veröffentlichung berichten KANTER, HOLLISTER et al. (22) von einer fraktionierten chromatographischen Auftrennung der extrahierten Substanzen. Mehr polare Metaboliten, die sich im Laufmittel Petrol-ether - Ether-Eisessig (50 : 50 : 1) nicht auftrennen ließen, wurden in Chloroform : Methanol (87 : 13) ein weiteres Mal entwickelt und deutlich separiert.

Zusammenfassend zu den bisher erwähnten Verfahren der dünnschichtchromatographischen Urinuntersuchungen muß gesagt werden, daß diese mehr oder weniger alle die zu Beginn dieses Kapitels geschilderten Nachteile aufzuweisen haben. Insbesondere die Unkenntnis der Ausscheidungsform des THC und damit zusammenhängend die Tatsache, kein spezifisches Fleckmuster ermitteln zu können, lassen diese Verfahren heutzutage nur noch als historisch einstufen. Es ist der Verdienst von WALL et al. (42), mit der weiteren Aufklärung des Metabolismus des THC, speziell der Ausscheidungsform, die Arbeiten auf dem Gebiet der Cannabis-

Forschung und -Identifizierung ein großes Stück weitergebracht zu haben. Folgerichtig beziehen sich alle weiteren dünnenschichtchromatographischen Isolierungsversuche von THC aus biologischem Material auf die THC-Carbonsäure.

Es waren wiederum KANTER, HOLLISTER et al. (25), die ein DC-Verfahren zur Identifikation von THC mit Hilfe des Urinmetaboliten THC-COOH entwickelten. Nach enzymatischer Hydrolyse wurde der Urin zweimal mit Ethylether ausgeschüttelt, dann aufgereinigt, der Extrakt auf eine DC-Platte getüpfelt und diese sukzessive in zwei verschiedenen Laufmitteln entwickelt. Nach Besprühen mit Echtblausalz ergab sich ein Fleck bei einem R_f von etwa 0,1. Die Empfindlichkeit des Verfahrens wird mit 5ng/ml bei Verwendung von 50 ml Urin angegeben.

Ein Verfahren zur Extraktion von konjugierter und unkonjugierter THC-Carbonsäure wird ebenfalls von KANTER, HOLLISTER et al. (26) beschrieben. Bei saurem pH wird mit Hexan-Diethylether zuerst unkonjugierte THC-COOH extrahiert, anschließend nach enzymatischer Hydrolyse mit Ether die konjugierte THC-COOH. Die Urinproben wurden nur bis zu sechs Stunden nach Haschischtaufnahme genommen, so daß zumindest in diesem Zeitraum auf Grund der abgebildeten Chromatogramme keine sichere Aussage zu machen ist, ob THC-COOH mehr in konjugierter oder unkonjugierter Form ausgeschieden wird. Bei größeren Zeitintervallen zwischen Haschischtaufnahme und Entnahme der Urinprobe verschiebt sich das anfängliche Gleichgewicht immer mehr zu Gunsten der konjugierten Form. Diese Tatsache deckt sich mit den Ausführungen von GREEN et al. (15), daß anfänglich etwa die Hälfte der im Urin präsenten THC-COOH ohne Hydrolyse extrahiert werden könne. KAISTHA et al. (21) extrahieren die THC-COOH, nach Hydrolyse mit 10 %iger methanolischer KOH-Lösung, mit einer Cyclohexan-Ethylacetat-Lösung. Nach

der dünnschichtchromatographischen Auftrennung ergibt sich ein THC-COOH-spezifischer Fleck im relativ weiten R_f -Bereich von 0,25 - 0,38. Quantitative Tests mit Delta-8-THC-COOH ergaben eine Empfindlichkeit von 10 ng/ml Urin bei einer Urinmenge von 10 bzw. 14 ml.

Die Vorschriften von KANTER, HOLLISTER et al. (25) und KAISTHA et al. (21) wurden durch VON MEYER (34) überprüft und dabei wurde festgestellt, daß vielfach eine Störung des Nachweises mit Echtblausalz durch mitextrahierte Begleitstoffe erfolgt.

Eine neue Ära zur dünnschichtchromatographischen Isolierung und Identifikation von Cannabinoiden im biologischen Material begann zu Anfang der Achtziger Jahre durch die Einführung der Festphasenextraktion. Die Methoden der Flüssig - Flüssig - Extraktion wurden zu Gunsten einer adsorptiven Anreicherung von THC-COOH an sogenannte Austauscherharze verlassen. Bis zur Jahresmitte 1985 lagen 5 Verfahren zur THC-COOH-Bestimmung mittels Festphasenextraktion in der Literatur vor. Im Prinzip funktionieren alle diese Verfahren nach dem selben Muster. Der erste Schritt besteht in der Hydrolyse des Urins, d.h. der hydrolytischen Abspaltung der Glucuronsäure von der THC-COOH. Dazu werden ausschließlich alkalische Lösungen verwendet, im Gegensatz zu früheren Verfahren, wo häufig Enzymlösungen wie z.B. Beta-Glucuronidase-Arylsulfatase zum Einsatz kamen. Je nach verwendetem Austauscherharz wird nun der pH des Hydrolysates eingestellt. Das Kernstück der Extraktion, die mit dem Harz gepackte Säule, wird der Vorschrift entsprechend konditioniert, der Urin in die Säule aufgegeben und unter Vakuum durchgesaugt. Nach der Aufreinigung und Trocknung der Säule wird die

THC-COOH mit einem Lösungsmittel eluiert, das Eluat auf die DC-Platte aufgetragen und anschließend mit einem Fließmittel getrennt. Die fünf Verfahren wurden von folgenden Autoren bzw. Firmen entwickelt:

1. Verfahren nach VON MEYER (34)
2. Verfahren CANNABUSE der Firma BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS
(7)
3. Verfahren nach VINSON et al. (41)
4. Verfahren nach ROESENER (36)
5. Verfahren nach WILLSON et al. (45) (28)

2. AUFGABENSTELLUNG

2.1 Untersuchung der vorhandenen Verfahren

Eine der Aufgaben dieser Arbeit besteht darin, die in der Literatur beschriebenen Verfahren zu überprüfen. Auf Grund der raschen Entwicklung auf diesem Gebiet erschien es angebracht, nur die neuesten Verfahren mit Festphasenextraktion nachzuarbeiten und die alten Verfahren mit Flüssig - Flüssig - Extraktion zumindest im Hinblick auf den Arbeitsschritt der Extraktion außer Acht zu lassen. Es sei in diesem Zusammenhang allerdings darauf hingewiesen, daß bei den neuen Verfahren viele Details von den alten übernommen bzw. entsprechend modifiziert wurden. Diese neuen Verfahren sollen zum einen hinsichtlich ihres Material- und Zeitaufwandes, zum anderen, was noch wichtiger erscheint, auf ihre Spezifität und Empfindlichkeit überprüft werden.

Die Vorschriften der geprüften Verfahren wurden, wenn nötig, vom Englischen ins Deutsche übersetzt und sind in einheitlicher Gliederung, in Anlehnung an die Vorschrift VON MEYER, im Kapitel Anhang in obiger Reihenfolge zu finden. Als Anmerkung am Ende der jeweiligen Vorschrift wurden, soweit dies zu ermitteln war, Verbindungen zwischen einzelnen Vorschriften aufgezeigt.

2.2 Entwicklung eines eigenen Verfahrens

Das andere Ziel dieser Arbeit ist, ein eigenes Verfahren zum dünnenschichtchromatographischen Nachweis von Cannabisinhaltsstoffen im Urin zu entwickeln. In den entscheidenden Kriterien Spezifität und Empfindlichkeit sollte es den vorhandenen Verfahren zumindest ebenbürtig oder gar überlegen sein. Des weiteren sollte der Einsatz von Material und Geld so niedrig wie möglich gehalten und der Zeit- und damit der personelle Aufwand optimiert werden. Die im

hiesigen Institut durchgeführten Routinekontrollen auf Cannabisinhaltsstoffe im Urin sollten mit dem neu entwickelten Verfahren durchgeführt werden, um dessen Brauchbarkeit in einem größeren Rahmen zu testen.

3. UNTERSUCHUNGSMATERIAL, MATERIALIEN UND METHODE

3.1 Untersuchungsmaterial

Die mehrfach durchgeführten Überprüfungen der in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Identifikation von Cannabisinhaltsstoffen im Urin bedurften einer größeren Menge an THC- haltigem Urin. Ebenso verhielt es sich mit dem neu zu entwickelnden Verfahren. Für diesen Zweck stand Sammelurin zur Verfügung, der aus dem Kieler Institut für Rechtsmedizin stammte. Darüber hinaus kamen Urine zum Einsatz, die routinemäßig an das Institut für Rechtsmedizin der Universität München zur Untersuchung auf Cannabisinhaltsstoffe eingeschickt werden. Diese Urine kommen hauptsächlich von der Polizei, der Bewährungshilfe, psychiatrischen Kliniken sowie von den in der Münchner Gegend ansässigen Drogenkliniken Condrops und Prop Alternative.

Mit dem "Kieler" Urin wurden vorwiegend die bestehenden Verfahren getestet als auch ein neues Verfahren entwickelt. Die "Routine"-Urine, soweit sie durch das vorgeschaltete EMIT - Verfahren als THC-positiv eingestuft werden konnten, dienten der Erprobung der Brauchbarkeit und Tauglichkeit des neu entwickelten Verfahrens sowie zweier in dieser Arbeit gezeigten Fotos bzw. deren Fotokopien (Abb. 5, 6). Bei allen anderen Abbildungen von Dünnschichtchromatogrammen (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) wurde der "Kieler Sammelurin" verwandt. Leerurin zur Verdünnung von cannabishaltigem Urin stammt vom Verfasser.

3.2 Materialien

Die zur Verwendung gelangten Chemikalien sind jeweils bei der Zusammenstellung der einzelnen Verfahren im Kapitel "Anhang" nachzulesen.

Es handelt sich dabei um Standardchemikalien ("pro analysi"), wie sie normalerweise in jedem chemischen Labor vorhanden sind. Hoch aufgereinigte Lösungen waren zur Durchführung der Verfahren nicht nötig. Bei dem Verfahren nach CANNABUSE stand ein Test-Kit mit allen benötigten Reagenzien zur Verfügung. Als technische Hilfen standen zur Verfügung: ein Vakuumgerät, mit dem die Stärke des Vakuums geregelt werden kann; ein BÜCHI Rotationsverdampfer; ein MULTI-PREPTM-TLC Spotter der Firma BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS (in der Bundesrepublik vertreten durch die Firma MACHEREY-NAGEL, Düren) zum direkten Auftragen des Eluats auf die DC-Platte. Die verschiedenen zur Anwendung gekommenen Extraktionssäulen sind wiederum aus dem Kapitel "Anhang" zu entnehmen. Die Standard DC-Platten waren welche des Fabrikats POLYGRAM SIL G/UV²⁵⁴ der Firma MACHEREY-NAGEL, Düren, sowie sogenannte Nanoplatten des Fabrikats HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone der Firma MERCK, Darmstadt.

3.3 Methoden

Die durchgeführten Verfahren sind, wie bereits erwähnt, im Kapitel "Anhang" ausführlich dargestellt. Die Großbuchstaben bei den Abbildungen von Chromatogrammen bedeuten folgendes:

R = Referenzverfahren (Verfahren nach VON MEYER),

S = Sample (wird jeweils im Text erklärt),

T = Testurin ("Kieler Sammelurin")

Die fünf überprüften Verfahren werden der Vereinfachung halber mit Großbuchstaben bezeichnet

A : Verfahren nach VON MEYER (34)

B : Verfahren CANNABUSE (7)

C : Verfahren nach VINSON et al. (41)

D : Verfahren nach ROESENER (36)

E : Verfahren nach WILLSON et al. (45)

4.EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.7 Untersuchung der in der Literatur beschriebenen Verfahren

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren (A - E) wurden in aller Regel genau nach Vorschrift nachgearbeitet. Abweichungen wurden dort vorgenommen, wo empfohlenes Gerät nicht zur Verfügung stand. Dies betrifft allerdings nur die Verwendung von HPTLC-Platten bei den Verfahren B und C, wo anstelle des empfohlenen Fabrikats WHATMAN solche der Firma MERCK zum Einsatz kamen. Bei Verfahren, bei denen hinsichtlich der Stärke des anzuwendenden Vakuums nichts Hinreichendes in der Originalvorschrift zu finden war, wurden diese Werte aus Erfahrungswerten bzw. in Anlehnung an detaillierte Beschreibungen anderer Verfahren ermittelt und festgesetzt.

Die Hydrolyse:

Die mit dem Urin ausgeschiedene THC-Carbonsäure liegt vorwiegend als Ester, gepaart mit Glucuronsäure, vor (42). Da die Extraktionen ausschließlich unkonjugierte THC-Carbonsäure erfassen, muß zunächst eine Hydrolyse vorgenommen werden. Die hydrolytische Spaltung erfolgt jeweils mit alkalischen Lösungen. Beim Verfahren A (Urineinsatz 10 ml) kommen dabei 3 ml 10 %ige KOH-Lösung in Methanol zur Anwendung. Die Molarität der KOH-Lösung beträgt ca.1,8, die Molarität von 10 ml plus KOH-Lösung ca. 0,4. Die Hydrolyse dauert bei einer Temperatur von 100 °C 12 Minuten. Die Art der Hydrolyse mit 10 %iger methanolischer KOH-Lösung wird in dem Verfahren KAISTHA (21) beschrieben. Eventuell im Urin vorliegende Eiweiße werden dabei sowohl durch die Temperatur als auch durch Methanol denaturiert. Inwieweit und ob überhaupt eine Erhöhung der Molarität der KOH-Lösung oder eine zeitliche Verlängerung der Hydrolyse die Ausbeute an unkonjugierter THC-Carbonsäure vergrößern

würde, wurde nicht geprüft.

Das Verfahren B gibt zwei Arten der Hydrolyse an. Für eine quantitative Analyse wird mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die einzusetzende Urinmenge 5 bzw. 2 ml wird mit 1,0 bzw. 0,4 ml 7 N KOH-Lösung versetzt. Dabei ergibt sich eine Gesamtmolarität von ca. 1,2. Auf Grund der in diesem Verfahren eingesetzten Urinmenge von nur 5 bzw. 2 ml wurde der Urin ausschließlich nach der Vorschrift für eine quantitative Analyse hydrolysiert, um in jedem Fall eine bessere Ausbeute zu erreichen.

Das Verfahren C arbeitet mit nur 2 ml Urin. Die Hydrolyse wird mit 0,2 ml 6 M NaOH-Lösung durchgeführt, die Gesamtmolarität von Urin und NaOH-Lösung beträgt 0,55. Die Verfasser führten eine Studie durch, bei welchen Zeiten und Temperaturen, jeweils unter Einsatz von 6 M NaOH-Lösung, die Ausbeute an unkonjugierter IHC-Carbonsäure am größten ist. Sie stellten mit Hilfe densitometrischer Verfahren fest, daß bei 60°C die Ausbeute um zwölf Prozent größer war als bei 25°C, bei jeweils 30 Minuten Hydrolysedauer. Eine Untersuchung mit verschiedenen langer Hydrolysedauer ergab allerdings ein Maximum an freier IHC-Carbonsäure bereits nach 20 Minuten.

Beim Verfahren D werden 10 ml Urin eingesetzt. Zur Hydrolyse dienen 0,9 ml 10 M NaOH-Lösung. Die Gesamtmolarität von Urin und NaOH-Lösung beträgt ca. 0,8. Die Hydrolyse dauert 15 Minuten im kochenden Wasserbad.

Das Verfahren E schließlich arbeitet mit 10 ml Urin. Die Hydrolyse wird mit 2 ml 10 M KOH-Lösung durchgeführt, und zwar 15 Minuten bei 50°C. Die Gesamtmolarität von Urin und KOH-Lösung liegt bei 1,6.

Signifikante Unterschiede in der Ausbeute an THC-Carbonsäure durch die verschiedenen Molaritäten, Temperaturbedingungen und Inkubationszeiten wurden nicht festgestellt, zumal bei einigen Verfahren mit Hydrolyseverfahren anderer Verfahren gearbeitet wurde und dabei unterschiedliche Endergebnisse nicht zu ermitteln waren.

Die pH-Einstellung:

Entsprechend den günstigsten Bedingungen für eine Extraktion der THC-Carbonsäure bei den angewandten Säulentypen wird der saure pH des Hydrolysats eingestellt. Die Verfahren A, B und C bedienen sich dabei 96 %iger Essigsäure, die Verfahren D und E konzentrierter Salzsäure. Leichter zu handhaben ist die Essigsäure, wohingegen die Zugabe von einem zehntel Milliliter Salzsäure zuviel den pH-Wert bereits um mehrere Punkte ändern kann. Es kann dabei zur Ausfällung der THC-Carbonsäure kommen, die dann nicht mehr in Lösung zu bringen ist und sich somit dem Nachweis entzieht.

Die Säulenkonditionierung:

Die fünf untersuchten Verfahren bedienen sich drei verschiedener Typen von Extraktionssäulen.

Die BAKER - 10 SPE - Säule, verwendet bei Verfahren A, ist eine sogenannte C_{18} -Säule. Die Säule ist gepackt mit Material, bei dem Octadecyl-Gruppen chemisch an Kieselgel gebunden sind. Es liegt eine sogenannte " reversed " Phase vor, da die zu bearbeitende Lösung polarer ist als der Inhalt der Säule. Laut Herstellervorschrift ist die Säule zuerst mit einer oder zwei Säulenvolumina Methanol unter Vakuum zu konditionieren, wobei die Säulenfüllung keinesfalls trocken werden darf. Danach wird ein Säulenvolumen einer Lösung durchgesaugt, die der zu bearbeitenden Lösung ähnlich sein sollte, in diesem Fall Wasser (6).

Bei den Verfahren B und C kommen Minibed-Säulen der Firma BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS mit AMBERLITE XAD - 2 - Austauscherharz zum Einsatz. Bei der Packung der Säule handelt es sich um ein unspezifisches Adsorbens auf Polystyrolbasis, das von ganz anderer chemischer Natur ist als die C_{18} - oder C_2 -Säulen. Die XAD - 2 - Säule beinhaltet noch einen Wattebausch, der dazu dient, größere Partikel im Hydrolysat vor der Extraktion im Austauscherharz auszufiltern. Eine aufwendige Konditionierung wie bei den Reverse - Phase - Säulen, wo verschiedene Lösungen vollständig durchgesaugt werden, gibt es bei der XAD - 2 - Säule nicht. Vielmehr wird eine Pufferlösung in die Säule gegeben, mit dem für die Extraktion des gesuchten Stoffes günstigsten pH-Wert. Die Pufferlösung enthält sieben Prozent eines Aktivators, der als n - Propanol identifiziert wurde. Auf die Pufferlösung wird das Hydrolysat gegeben und beides anschließend durchgesaugt.

Die Verfahren D und E arbeiten mit BOND-ELUT- C_2 -Säulen. Diese C_2 - Säulen enthalten eine Diol-Phase, wobei die zu extrahierende Lösung weniger polar ist als die Säulenpackung. Die C_2 - Säule wird auch als spezielle BOND-ELUT-THC-Cannabinoide-Phase angeboten, die identisch ist mit der Diol-Phase, lediglich vor dem Abfüllen auf Effektivität getestet wurde. Nach ROESENER (36) erbringen beide Phasen das gleiche Ergebnis. Obwohl Verfahren D und E identische Säulentypen verwenden, wird die Säulenkonditionierung mit verschiedenen Lösungen vorgenommen. Dies hängt damit zusammen, daß das Hydrolysat des Verfahrens D einen pH-Wert von 2 besitzt, im Gegensatz zu pH 5 bei Verfahren E. Während bei Verfahren D die Säule jeweils mit einem Säulenvolumen Methanol/Wasser/Methanol/Wasser konditioniert wird, wird das zweite Säulenvolumen Methanol bei Verfahren E durch 0,1 N Salzsäure ersetzt. Wiederum darf

die Säulenfüllung nicht trocken werden. Die exakte Einhaltung der Konditionierungsvolumina ist nicht entscheidend, sodaß die Lösungen auch mit der Spritzflasche aufgegeben werden können. Getrocknete Säulenfüllungen müssen nochmals konditioniert werden (3).

Die Extraktion:

Nach der Konditionierung der Säule wurde das Hydrolysat durch die Säule durchgesaugt. Genaue Anweisungen hinsichtlich der angewendeten Stärke des Vakuums finden sich nur in den Vorschriften der Verfahren B und C. Aufgrund des geringen Urineinsatzes ist ein Vakuum von 2-3" Hg anzuwenden. Bei den übrigen Verfahren wurde mit verschiedenen Vakuumstärken experimentiert, so unter anderem mit 15" Hg. Dabei ergab sich, daß im Vergleich mit 4-5" Hg die Ausbeute an THC-Carbonsäure beim schnellen Durchsaugen praktisch null war. Mit einer Vakuumstärke von 4-5" Hg wurde eine sehr gute Ausbeute bei vertretbarem Zeitaufwand erzielt. Die angegebenen Vakuumstärken sind unter allen Umständen einzuhalten, da nur diese gewährleisten, daß eine Adsorption des zu extrahierenden Stoffes am jeweiligen Austauschharz erfolgen kann. Vorfilter bei BAKER-SPE-Säulen (Verfahren A) sowie der Wattebausch bei XAD-2-Säulen (Verfahren B) wurden anschließend entfernt, bei Verfahren B mit nur 2 ml Urineinsatz und bei Verfahren C wurde der Wattebausch bereits vor Aufgabe des Konditionierungspuffers entnommen.

Die Aufreinigung:

Das Ziel der Aufreinigung ist, mitextrahierte Begleitstoffe wie Harnsäuren und Harnfarbstoffe, die das Chromatogramm stören oder verschmutzen würden, zu eliminieren, ohne allerdings die gesuchte Substanz ebenfalls aus der Säule herauszulösen. Die Affinität der gesuchten Substanz

zum Austauscherharz muß daher größer sein als zu den angewandten Waschlösungen. Die Verfahren A, B und C bedienen sich dabei pH-neutraler bzw. schwach saurer Lösungen.

Bei Verfahren A wurde die Säule mit jeweils 1 ml Aqua dest./ 5 %iger NaHCO_3 Lösung/Aqua dest. durchgespült. Bei Verfahren B kamen je nach eingesetzter Urinmenge 10 bzw. 4 ml, bei Verfahren C 5 ml 50 %iger Methanol-Lösung für die Säulenwäsche zur Anwendung. Die C_2 -Säulen der Verfahren D und E wurden erst mit 10 ml 0,1 M Salzsäure, dann mit 25 ml einer Lösung von Acetonitril und 50 mM Phosphorsäure im Verhältnis 1 : 9 gereinigt.

Mit Ausnahme des Verfahrens E wurden die Säulen der anderen Verfahren anschließend mit einem Vakuum von mindestens 15" Hg trockengesaugt, beim Verfahren A wurde die Trocknung durch Aufgabe von 50 Mikroliter Aceton, das in der Säule verbliebenes Wasser bindet, unterstützt. Die Trockendauer sollte mindestens 5 Minuten betragen, besser noch länger. Bei Verfahren A und D später miteluiertes Wasser würde das Eindampfen des Eluats unnötig verlängern, bei Verfahren B und C würde miteluiertes Wasser über den MULTII-PREP-Spotter direkt auf die Dünnschichtplatte gelangen und diese erheblich beschädigen oder sogar unbrauchbar machen.

Im Vergleich zur dunkelbraunen Färbung einer nicht aufgereinigten Säule hat das Austauscherharz nach der Säulenwäsche fast wieder ihre ursprünglich helle Farbe. Beim Verfahren E wurde nicht trockengesaugt, sondern sofort mit 1 ml Aceton eluiert. Das Eluat wurde sodann einer weiteren Aufreinigung unterzogen. Nach Zugabe von 0,5 ml Dichlormethan wurde die Mixtur geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase abpipettiert und der verbleibenden Phase 0,5 ml Hexan hinzugefügt. Es wurde

nun wiederum geschüttelt und zentrifugiert. Die obere Phase enthielt die THC-Carbonsäure.

Die Elution und das Auftragen auf die Dünnschichtplatte:

Zur Elution sind organische Lösungsmittel nötig, deren Affinität zur THC-Carbonsäure größer ist als die zwischen der THC-Carbonsäure und dem Austauschharz.

Beim Verfahren A wurde mit zweimal 200 Mikroliter Aceton, bei Verfahren D mit 1,7 ml Acetonitril, jeweils unter schwachem Vakuum, in ein kleines Glasgefäß eluiert, und das Eluat entweder mit Hilfe des Vakuumgerätes oder des BÜCHI Rotationsverdampfers zur Trockne eingedampft. Der Rückstand an den Wänden des Glasgefäßes wurde dann dreimal hintereinander mit 10 Mikroliter Methanol aufgenommen und jeweils mit feinen Kapillarröhrchen vollständig auf die DC-Platte aufgetüpfelt. Bei vorsichtigem Auftragen ergaben sich Fleckgrößen von etwa 4 mm Durchmesser.

Mit dem zur Verfügung stehenden MULTI-PREP-Spotter konnte bei den Verfahren B und C die Elution und das Auftragen in einem Arbeitsgang erledigt werden. Die getrocknete XAD-2-Säule wurde dazu auf dem mit der DC-Platte und den mit Kieselgur gefüllten Spitzen bereits vorbereiteten Spotter gesetzt. Dann wurde in die Säule 1,7 ml Elutionslösung (Ethylacetat:Isopropanol / 85:15) pipettiert, die durch Schwerkraft in und durch die Kieselgurspitzen auf die 90° C heiße Platte fließt. Es wurde dabei festgestellt, daß etwa 0,3-0,4 ml Elutionsflüssigkeit in der Säulenpackung zurückbleiben. Dieser Rest wurde mit Druck entfernt und an anderer Stelle der Platte aufgetragen, um zu prüfen, ob noch THC-Carbonsäure vorhanden war. Dies war nicht der Fall.

Weiterhin wurde überprüft, wie sich unterschiedliche Mengen an Elutionslösung auf die Ausbeute auswirken. Zu diesem Zweck wurden vier identische Urine extrahiert und mit jeweils 1,0, 1,25, 1,5 und 1,7 ml eluiert. Es zeigte sich, daß mit aufsteigenden Mengen an Elutionslösung die Ergebnisse auf dem Chromatogramm besser wurden. Größere Mengen an Elutionslösung wurden nicht verwendet, da anzunehmen ist, daß die Verfasser dieser Verfahren die Art und Weise der Elution optimiert haben und obendrein bei 1,7 ml in den in der Säule verbliebenen Mengen keine THC-Carbonsäure mehr zu finden war.

Gegenüber dem herkömmlichen Auftragen des Eluats per Kapillarröhrchen ergaben sich zeitweise Schwierigkeiten bei der Handhabung des MULTI-PREP-Spotters. Während kieselbeschichtete Platten aus Plastik das Auflegen auf die 90 °C heiße Heizplatte des Spotters ohne Schaden überstanden, hob sich bei den Nanoplatten des öfteren die Kieselgelschicht von der Glasplatte ab. Nach telefonischer Auskunft des Herstellers dieser Platte sollten diese sehr langsam auf 90 °C erwärmt werden; trotzdem aber passierte es, daß sich einige Minuten nach Beginn des Auftragens die Schicht abzulösen begann und damit die DC-Platte unbrauchbar wurde und die gesamte Prozedur hinfällig war. Auch die ungleichmäßige Fertigung der mit Kieselgur gefüllten Spitzen gab Anlaß zur Kritik. Die dabei erzielten Auftragsflecke waren ungleich groß, was nach Entwicklung des Chromatogrammes und Sichtbarmachung der THC-Carbonsäure einen quantitativen Vergleich mit einer mitlaufenden THC-Standardlösung zumindest bedenklich erscheinen läßt. Zuweilen hing die Durchlaufgeschwindigkeit des Eluats durch die Spitzen von der mehr oder weniger starken Konzentration und Verunreinigung des zu untersuchenden Urines ab.

Als Vorteile des Gebrauchs des MULTI-PREP-Spotters gelten, daß die Arbeitsgänge des Eindampfens und Auftragens

per Hand entfallen und daß geringe Wassermengen im Eluat von der Kieselgelfüllung absorbiert werden.

Die Entwicklung des Chromatogramms und die Detektion der THC-Carbonsäure:

Zur Entwicklung der Chromatogramme standen übliche DC-Tanks mit Glasdeckel zur Verfügung. In der Regel wurden diese bereits zu Beginn der Durchführung des Versuches mit dem jeweiligen Fließmittelgemisch gefüllt, um eine Kammer-sättigung zu erreichen. Bei den Verfahren A - D ist je ein Fließmittel angegeben, bei Verfahren E drei.

Die Laufstrecken betragen jeweils 6,5 cm, bei den Standard-DC-Platten vom Auftragspunkt aus, bei den Nano-platten mit Konzentrierungszone von der untersten Kante aus gemessen. Bei den Standard-DC-Platten wurden auch Laufstrecken von 10 cm gewählt, es stellte sich aber neben der verlängerten Zeitdauer der Entwicklung heraus, daß die erzielten Flecke, die die THC-Carbonsäure repräsentieren, größer wurden. Dies wurde aber im Hinblick auf die oft sehr geringen Mengen an gesuchter Substanz als Nachteil gewertet.

Die Formen der Flecke bei den Standard-DC-Platten waren oval bis rund, teilweise auch in Form eines Bumerangs. Die Breite der Flecke entsprach jeweils der des Auftragsflecks. Bei Verwendung von Nanoplatten ergaben sich Flecke in Form eines dicken, queren Striches. Dies ist auf das dabei verwendete Fließmittel und die Wirkung der Konzentrieungszone zurückzuführen. Die auf den Nanoplatten erzielten Flecke waren von wesentlich kleinerer Fläche als die auf den Standard-DC-Platten und dadurch von höherer Konzentration des Farbstoffes.

Alle acht angegebenen Fließmittel wurden auf Standard-DC-Platten geprüft (**8a - 8g**). Sieben davon waren

saurer Natur, eines alkalischer. Die Zeiten, bis die 6,5 cm lange Laufstrecke zurückgelegt war, bewegten sich zwischen 10 und 25 Minuten, lediglich die Fließmittel mit H_2O -Anteil nahmen zum Teil über eine Stunde in Anspruch.

Die Fließmittel der Verfahren A, D und E ergaben brauchbare Trennleistungen und R_f -Werte von 0,25 - 0,85. Am weitaus günstigsten schnitt allerdings das Fließmittel des Verfahrens A ab, weil mitgelaufene Verunreinigungen weit außerhalb des R_f -Wertes der gesuchten Substanz lagen. Bei den Fließmitteln der Verfahren D und E verteilten sich die Verunreinigungen über die gesamte Laufstrecke.

Die Fließmittel der Verfahren B und C sind bei Verwendung von Standard-DC-Platten unbrauchbar, da sie zum einen zu geringe R_f -Werte ergaben (ca. 0,05 - 0,08), zum anderen mitextrahierte Harnfarbstoffe und andere Verunreinigungen im selben Bereich lagen. Verfahren B gibt zwar die Möglichkeit der Verwendung von Standard-DC-Platten an, erwähnt allerdings im Hinblick auf deren oben erwähnter Nachteile nur den mit Nanoplatten erzielten R_f -Wert. Dementsprechend empfehlen die Verfahren B und C die Verwendung von Nanoplatten (engl.: High Performance Thin layer Chromatography (HPTLC) Plates). Verunreinigungen liefen dabei kaum mit, sondern blieben zum größten Teil auf der Konzentrierungszone hängen. Versuche mit der Kombination Nanoplatte/Fließmittel Verfahren A ergaben in dieser Hinsicht unbefriedigende Ergebnisse, weil die Verunreinigungen nicht in der Konzentrierungszone zurückblieben.

Die Detektion der unsichtbaren Substanz THC-Carbonsäure wird durch eine Färbereaktion mit Hilfe einer Echt-

blausalzlösung, die gewöhnlich aufgesprüht wurde, bewerkstelligt. Die DC-Platten wurden dazu mit dem auf 90 °C eingestellten MULTI-PREP-Spotter oder mit einem Föhn so lange getrocknet, bis die Fließmittel völlig abgedampft waren. Die Echtblausalzlösungen wurden grundsätzlich erst danach angesetzt und die Platte damit unter der Abzughaube besprüht. Anschließend wurde die Platte entweder auf dem 75 °C heißen MULTI-PREP-Spotter oder mit dem Föhn getrocknet, bis die gesuchten roten Flecke erschienen. Wenn trotz mitlaufender positiver THC-Probe keine Flecke erkennbar waren, lag es daran, daß noch saure Reaktion aus dem Fließmittel auf der Platte vorhanden war, die eine Farb-reaktion zwischen THC-Metaboliten und Echtblausalz nicht zuläßt. Zu diesem Zweck wurde die Platte mit einer milden alkalischen Lösung, z. B. 5 %iger NaHCO_3 -Lösung, nachbesprüht und somit die Farbreaktion in Gang gebracht.

4.2. Erarbeitung eines eigenen Verfahrens

Nach der Überprüfung der in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Identifikation von Haschischbestandteilen im Urin mittels Dünnschichtchromatographie war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, ein eigenes Verfahren dieser Art zu entwickeln.

Dazu waren eine Reihe von Kriterien vorgegeben, die zu erfüllen waren. Die Extraktion sollte mit XAD-2-Säulen durchgeführt werden, da sie zum einen wesentlich preisgünstiger sind als C_{18} - oder C_2 -Säulen, zum anderen, weil sie im hiesigen Institut fast ausschließlich für Extraktionsverfahren Verwendung finden. Die Ausbeute an gesuchter Substanz und damit die Empfindlichkeit des Verfahrens sollte, verglichen mit bereits bekannten Verfahren, ebenso hoch oder besser sein. Der Aufwand an Material, Ausrüstung und Zeit sollte den der anderen Verfahren nicht übersteigen.

Wie schon beschrieben, arbeiten die Verfahren nach CANNABUSE (7) und VINSON (41) mit den XAD-2-Säulen, jeweils unter Einsatz von 5 bzw. 2 ml Urin. Demgegenüber wurde festgelegt, bei dem zu entwickelnden Verfahren mit 10 ml Urin zu arbeiten, was bedeutet, im Vergleich mit den obigen Verfahren, die zwei- bzw. fünffache Menge an THC im Urin vorliegen zu haben. Es hatte sich nämlich herausgestellt, daß mit den geringen Urinmengen obiger Verfahren unter Verwendung von normalen Dünnschichtplatten befriedigende Resultate, etwa vergleichbar mit denen des gewählten Referenzverfahrens nach VON MEYER (34), nicht erzielt werden konnten. Die bloße Steigerung der Urinmenge auf 10 ml, unter exakter Beibehaltung der anderen Schritte in den Arbeitsvorschriften ergab jedoch, daß auf das Chromatogramm zu viele Urinbegleitstoffe und -verunreinigungen mitgeschleppt wurden, die die Identifikation der gesuchten Substanz auf der Dünnschichtplatte erschwerten oder nahezu unmöglich machten.

Die Problematik bestand also darin, das Verfahren, insbesondere aber die Aufreinigung dahingehend zu modifizieren, daß mitextrahierte Verunreinigungen zumindest weit außerhalb des zu erwartenden R_f -Wertes der THC-Carbonsäure lagen.

Die Hydrolysemethoden der überprüften Verfahren sind, was sowohl die Art der chemischen Reaktion als auch deren Effizienz betrifft, sehr ähnlich. Auf Grund der Säulenkonditionierung, die durch einen Alkohol bewirkt wird, wurde dem Hydrolyseverfahren nach VON MEYER (34), das auch schon von KAISTHA (21) beschrieben wurde, der Vorzug gegeben. Die Hydrolyse wurde also jeweils mit 3 ml 10 %iger KOH-Lösung in Methanol vorgenommen, wobei 12 Minuten bei 100°C im Aluminiumblock inkubiert wurde.

Nach dem Abkühlen des Hydrolysats auf Raumtemperatur wurde dessen pH durch Zugabe von 3 ml 96 %iger Essigsäure auf den Wert 4 eingestellt. Geringfügige pH-Wertschwankungen werden durch die Pufferlösung zur Säulenkonditionierung ausgeglichen.

Die Säulenkonditionierung wurde mit der beim Verfahren CANNABUSE (7) verwendeten Pufferlösung vorgenommen: 0,2 M Acetat-Puffer pH 4 mit 7 % Aktivator. Bei dem Aktivator handelt es sich, wie bereits festgestellt, um n-Propanol. Auf die Pufferlösung wurde dann das Hydrolysat aufgegeben und die Vakuumpumpe eingeschaltet. Bei einer Vakuumstärke von 4" Hg war der Säuleninhalt in 5 - 10 Minuten, je nach Konzentration des Urins, durch die Säule durchgesaugt. Versuche mit geringfügig veränderten Vakuumstärken ± 1 ergab in der Ausbeute an THC-Carbonsäure keine signifikanten Unterschiede. Nach dem Durchlauf wurde der obere als Vorfilter wirkende Wattebausch aus der Säule entfernt.

Ihre Effizienz in der Extraktion hatte die XAD-2-Säule in den Verfahren nach CANNABUSE (7) und VINSON (41) bereits bewiesen, allerdings unter Verwendung von nur 5 bzw. 2 ml Urin und HPTLC-Dünnschichtplatten, die den größten Teil der mitextrahierten und durch die Aufreinigung nicht entfernten Verunreinigungen auf ihrer Konzentrationszone zurückhalten. Die Überprüfung des Verfahrens nach CANNABUSE (7) hatte schon ergeben, daß die Verwendung von Standard-Dünnschichtplatten hinsichtlich der Verunreinigungen kein befriedigendes Ergebnis erbrachten. Es mußte also die Aufreinigung bei dem neu zu entwickelnden Verfahren entsprechend modifiziert werden.

Die wichtigsten Versuche zur Aufreinigung der Säule sind in den Abbildungen 9 und 10 fotografisch festgehalten, wobei jeweils die erste Spur von links die von uns benutzte Referenzmethode nach VON MLYER (34) darstellt.

Anfangs wurde versucht, analog zum Verfahren CANNABUSE (7), mit 20 ml 50 %iger Methanol-Lösung, das entspricht der zweifachen Menge des Urineinsatzes, die Säule zu waschen, bei einem weiteren Versuch mit 40 ml. Beide Male verteilten sich die noch vorhandenen erheblichen Verunreinigungen über die gesamte Laufstrecke des Chromatogramms, insbesondere aber auch in dem Bereich des R_f - Wertes von IHC-COOH, sodaß trotz des erwiesenermaßen relativ hohen Gehaltes im Testurin die gesuchte Substanz kaum erkennbar war. Im Folgenden wurde versucht, die Aufreinigungsmethode nach VON MEYER (34), geltend für die C_{18} -Säulen, auf die XAD-2-Säulen anzuwenden. Auch der Einsatz von je 10 ml $H_2O/NaHCO_3/H_2O$ sowie die Verdoppelung dieser Mengen erbrachte ein nicht akzeptables Ergebnis auf dem Chromatogramm, d.h. Verunreinigungen über die gesamte Laufstrecke ähnlich wie beim alleinigen Einsatz der 50 %-igen Methanol-Lösung (Abb. 9).

Nun wurde überprüft, ob die Kombination von $H_2O/NaHCO_3/H_2O$ und Methanol-Lösung die Aufreinigung der Säulenfüllung bewältigen kann. Dazu wurden vier Extraktionen mit jeweils 10 ml des gleichen Urins vorgenommen und Säulen folgendermaßen gewaschen; jeweils bei Vakuum 4" Hg:

- A: je 10 ml $H_2O/NaHCO_3/H_2O$ und 20 ml Methanol-Lösung
- B: 20 ml Methanol-Lösung und je 10 ml $H_2O/NaHCO_3/H_2O$
- C: je 20 ml $H_2O/NaHCO_3/H_2O$ und 40 ml Methanol-Lösung
- D: 40 ml Methanol-Lösung und je 20 ml $H_2O/NaHCO_3/H_2O$

Auf dem Chromatogramm waren nun Verunreinigungen durch mitextrahierte Begleitstoffe kaum mehr auszumachen, sie erschienen nur noch am oberen Ende der Laufstrecke, also sehr weit entfernt vom erzielten R_f -Wert 0,33 für die IHC-Carbonsäure. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die Waschmethoden A und C, beginnend mit $H_2O/NaHCO_3/H_2O$

eine noch bessere Aufreinigung erbrachten als umgekehrt, mit der Methanol-Lösung beginnend (Waschmethoden B und D). Es zeigte sich auch, daß die Waschmethoden A und B eine bei weitem ausreichende Menge an Waschsubstanz bedeuteten, zumal bei C und D deutlich weniger gesuchte Substanz auf dem Chromatogramm erschien, also durch die relativ große Menge an Waschsubstanz einiges an THC-Carbonsäure aus der Säule entfernt wurde.

Folglich wurde versucht, durch sukzessive Verringerung der Mengen an Waschsubstanz ein bestmögliches Gleichgewicht zwischen Ausbeute an Substanz und Qualität der Aufreinigung zu erzielen. Vor allem mußte die Menge an 5 %iger NaHCO_3 -Lösung verringert werden, da diese die Säulenfüllung regelrecht verstopften, sodaß die nachfolgenden Waschsubstanzen nur noch mit hohem Vakuum durchgesaugt werden konnten. Es stellte sich heraus, daß mit der halben Menge an Waschsubstanz aus der Waschkvorschritt A das beste Ergebnis hinsichtlich Ausbeute und Aufreinigung gefunden wurde. Dies gilt sowohl für hochkonzentrierten als auch für niedrigkonzentrierten Urin. Zum Beweis der optimalen Aufreinigung dient die Abbildung 10. Sie zeigt auch, daß die Reihenfolge der aufzugebenden Waschsubstanzen von großer Bedeutung ist. Beginnend mit der Methanol-Lösung werden wesentlich weniger Verunreinigungen entfernt, die obendrein im Chromatogramm auch noch im Bereich des R_f -Wertes der gesuchten Substanz zu liegen kommen. Diese Tatsache ist vor allem bei einer sehr kleinen Menge an vorliegender THC-Carbonsäure problematisch, weil der feine rote Fleck auch im Durchlicht unter der Verunreinigung nicht mehr zu identifizieren ist.

Der nächste Arbeitsschritt bestand darin, das in der Säulenfüllung enthaltene Wasser zu entfernen. Dazu wurde vorerst die Vorschrift aus dem Verfahren CANNABUSE (7) übernommen. Die Säule wurde bei einem Vakuum von minde-

stens 15" Hg 5 Minuten trockengesaugt. Es wurde festgestellt, daß dabei noch geringe Mengen Wasser in der Säule zurückblieben. (Beim Verfahren nach CANNABUSE wird dieser Nachteil durch die besondere Art des Auftragens mit Kieselgurspitzen, welche geringe Mengen an Restwasser absorbieren, kompensiert). Auch geringste Mengen an Wasser verzögerten später den Vorgang des Eindampfens erheblich. Zur Lösung dieses Problems wurde auf eine entsprechende Vorschrift aus dem Verfahren nach VON MEYER (34) zurückgegriffen, wobei vor dem Trockensaugen eine kleine Menge Aceton in die Säule pipettiert wird. Dazu wurde wiederum eine Testreihe durchgeführt, bei der jeweils 50, 75, 100, 125 und 150 Mikroliter Aceton vor dem Trockensaugen in die Säule aufgegeben wurden. Bei 50 Mikroliter wurde nicht alles Wasser entfernt, bei 100, 125 und 150 Mikroliter wurde alles Wasser, aber auch bereits geringe Mengen an THC-Carbonsäure aus der Säulenfüllung entfernt. Als beste Lösung ergab sich, zuerst mit einem saugfähigen Papiertuch an den Wänden der Säule hängende Wassertropfen zu beseitigen, anschließend 75 Mikroliter Aceton in die Säule zu pipettieren und dann die Vakuumpumpe, wie oben beschrieben, zu betätigen. Nach dem Trockensaugen wurde das Vakuumgerät gesäubert und das Rack mit den Probensammelgläsern in das Extraktionssystem eingesetzt. Nun wurden 1,7 ml Aceton in die Säule pipettiert, die in etwa 2 - 3 Minuten durch Schwerkraft in die Probensammelgläser fließen. Dazu darf die Vakuumpumpe keinesfalls betätigt werden, damit die Elutionsflüssigkeit in der Lage ist, alles an THC-Carbonsäure aus der Säulenfüllung herauszulösen. Versuche mit unterschiedlichen Mengen an Elutionslösung wurden bereits bei der Überprüfung der bestehenden Verfahren durchgeführt. Auch die Verwendung von Ethylacetat:Isopropanol (85:15), wie im Verfahren nach CANNABUSE (7), erbrachte keine Unterschiede.

Anschließend wurde das Eluat im Vakuum, Stickstoffstrom oder BÜCHI Rotationsverdampfer zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wurde dreimal mit 10 Mikroliter Methanol aufgenommen und auf die Dünnschichtplatte aufgetupft. Eine Zeitlang stand ein MULTI-PREP-TLC Spotter der Firma BIO-CHEMICAL DIAGNOSTICS zur Verfügung, mit dessen Hilfe nach dem Trockensaugen die Arbeitsschritte Elution und Auftragen auf die Dünnschichtplatte in einem Arbeitsgang erledigt werden konnten. Bei akkuratem Auftragen per Hand ergaben sich allerdings keine Unterschiede in der Ausbeute im Vergleich dazu. Es konnten im Gegenteil per Hand leichter gleichgroße Auftragsflecke erzielt werden, was einen Vergleich verschiedener Eluate betreffs Gehalt an IHC-Carbonsäure eher ermöglicht als ungleich große Auftragsflecke bei Benutzung des MULTI-PREP-TLC Spotters. Bei der Überprüfung der verschiedenen Fließmittel der bereits bestehenden Verfahren zeigte dasjenige des Verfahrens nach VON MEYER (34) auf Standard-Dünnschichtplatten das beste Ergebnis. Dementsprechend wurde auch der Arbeitsschritt Aufreinigung bei dem neu entwickelten Verfahren so gestaltet, daß eventuelle Verunreinigungen auf dem Chromatogramm weit außerhalb des dabei erzielten R_f -Wertes von ca. 0,33 lagen. Die Entwicklung der Dünnschichtplatte nahm bei einer Laufstrecke von 6,5 cm etwa 20 min. in Anspruch, vorausgesetzt, das Fließmittel wurde erst zu Beginn des Verfahrens, also etwa zwei Stunden vorher, frisch angesetzt.

Die Detektion der unsichtbaren Substanz IHC-Carbonsäure wird durch eine Farbreaktion mit Echtblausalz RR durchgeführt. Die Echtblausalz-Lösung wurde grundsätzlich erst unmittelbar vor dem Aufsprühen auf die Dünnschichtplatte angesetzt. Das Salz reagiert mit der IHC-Carbonsäure unter Bildung eines pinkfarbenen Fleckes.

Bei Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß verfärbten sich die mit Fichtblausalz RR besprühten Platten ins rötliche, jeweils nach 24 bis 48 Stunden. Manchmal trat nach dieser Zeit eine farbliche Verstärkung des pinkfarbenen Fleckes ein.

5. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

5.1 Vergleichende Untersuchung der in der Literatur beschriebenen Verfahren

Während bei früheren Verfahren bis zu 50 ml Urin aufgearbeitet werden mußten, um ausreichende Mengen an Haschischbestandteilen zu isolieren, bedürfen die neuen Dünnschichtverfahren mit Festphasen-Extraktion nur 10 ml, teilweise nur 5 oder 2 ml Urin. Dies kann im Hinblick auf die meist gering vorliegende Urinmenge als Vorteil bezeichnet werden, da mit dem übrig gebliebenen Urin auch andere Untersuchungen auf Haschischbestandteile sowie auf weitere im Urin vorhandene Suchtstoffe durchgeführt werden können. Um zu ermitteln, wie sich die bei den jeweiligen Verfahren einzusetzenden Urinmengen auf das Ergebnis auf dem Chromatogramm auswirken, wurde eine Testreihe durchgeführt, in der der Testurin in Stufen verdünnt wurde. Es zeigte sich, daß bei einer Verdünnung von 2 zu 10 (2 Teile haschischhaltiger Urin, 8 Teile Leerurin) das Verfahren mit insgesamt 2 ml Urineinsatz kein positives Ergebnis auf dem Chromatogramm erbrachte, jeweils unter Benutzung der empfindlicheren HPTLC-Dünnschichtplatten (Nanoplaten). Die Versuchsreihe wurde mit der Verdünnung 1 zu 10 fortgesetzt, wobei von den Verfahren mit 10 ml Urineinsatz dasjenige nach VON MEYER (34) und das nach CANNABUSE (7) mit 5 ml Urineinsatz geprüft wurden. Das Ergebnis ist auf Abbildung 13 dokumentiert. Das Verfahren nach VON MEYER zeigt einen sehr schwachen, aber noch erkennbaren Fleck auf dem Chromatogramm, wohingegen beim Verfahren nach CANNABUSE auch im Durchlicht kein roter Fleck zu erkennen ist. Es darf somit als gesichert gelten, daß der Einsatz von 10 ml gegenüber 5 oder 2 ml Urin insbesondere bei Vorliegen kleiner Mengen an THC-Carbonsäure ein absoluter Vorteil ist.

Der Vergleich der unterschiedlichen Hydrolysemethoden ergab, soweit sich das aus dünnschichtchromatographischen Resultaten ermitteln läßt, keine signifikanten Unterschiede, zumal keine nicht-dünnschichtchromatographischen Verfahren, wie z. B. Gaschromatographie, herangezogen wurden, um exakt die Prozentsätze der jeweils aus ihrer Verbindung mit Glucuronsäure gelösten Mengen an IHC-Carbonsäure zu messen. VINSON et al. (41) führten eine derartige Studie mit 6 M NaOH durch, wobei sie fanden, daß bei 60 °C nach 20 min. ein Maximum an freier IHC-Carbonsäure vorlag.

Die Arbeitsschritte pH-Einstellung, Säulenkonditionierung und Extraktion lassen auf Grund der unterschiedlichen Typen verwendeter Säulen keinen direkten Vergleich zu. Lediglich bei den Verfahren mit C₂-Säulen nach WILLSON et al. (45) und ROISENER (36) sind die Arbeitsschritte pH-Einstellung und Säulenkonditionierung verschieden, sie lassen sich aber hinsichtlich der weitergehenden Aufreinigung beim Verfahren nach WILLSON et al. nicht im Ergebnis auf dem Chromatogramm vergleichen.

Die Aufreinigung nach WILLSON ergibt gegenüber allen anderen Verfahren die mit Abstand saubersten Extrakte auf dem Chromatogramm, wobei aber nicht auszuschließen ist, daß durch das zweimalige Abpipettieren der jeweiligen oberen Phase geringe Verluste an gesuchter Substanz möglich sind. Die Aufreinigungsergebnisse, die bei den anderen Methoden erzielt werden, reichen von gut (V. MEYER) bis weniger gut (CANNABUSE, VINSON, ROISENER). Die Qualität der Aufreinigung muß allerdings immer in Relation gesetzt werden zum Typ der verwendeten Dünnschichtplatte, zum jeweiligen Fließmittel und zur Tatsache, daß eine stärkere Aufreinigung mit dem Verlust an gesuchter Substanz einhergeht. In dieser Hinsicht stellt das Verfahren nach VON

MEYER den besten Kompromiß dar.

Der Arbeitsschritt Elution ist bei den Verfahren nach CANNABUSE und VINSON unter Verwendung des MULTI-PREP-Spotters mit dem Auftragen des Eluats auf die DC-Platte kombiniert. Dies erspart zwar das Eindampfen des Eluats und das Auftragen per Hand, aber der Durchsatz durch die Spitzen stockt zuweilen oder ist unterschiedlich schnell, sodaß nicht immer gleichmäßig große Auftragsflecke auf der DC-Platte erzielt werden können. Die bei den fünf Verfahren angegebenen Elutionsmittel Aceton, Acetonitril und Ethylacetat-Isopropanol ergaben in einer Testreihe keine unterschiedliche Effizienz im Herauslösen der gesuchten Substanz aus den verschiedenen Säulentypen. (Dem Vergleich der verschiedenen Fließmittel ist ein eigenes Kapitel gewidmet).

Zur Detektion standen Echtblausalz BB und Echtblausalz RR zur Verfügung. Im Gegensatz zu den Ausführungen von VINSON, der in seinen Untersuchungen das Echtblausalz BB als die Detektionssubstanz mit der höchsten Empfindlichkeit ermittelte, ergaben sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleichsuntersuchungen wegen der etwas stärkeren Farbintensität Vorteile bei der Anwendung von Echtblausalz RR. Diese Bewertung ist allerdings subjektiv, da sie mit bloßem Auge und nicht mit der Hilfe von densitometrischen Verfahren erfolgte.

Das weitaus wichtigste Kriterium bei den getesteten Verfahren war deren Empfindlichkeit, d. h. welcher Anteil an THC-Carbonsäure in einem definierten Volumen Urin läßt sich dünnschichtchromatographisch gerade noch nachweisen. Folgende Nachweisempfindlichkeiten werden von den Autoren angegeben:

VON MEYER (34): 10 ng THC-COOH/ml Urin bei Verwendung
von 10 ml Urin
CANNABUSE (7): 10 ng THC-COOH/ml Urin bei Verwendung
von 5 bzw. 2 ml Urin
VINSON (41): 10 ng THC-COOH/ml Urin bei Verwendung
von 2 ml Urin
WILLSON (45): 20 ng THC-COOH/ml Urin bei Verwendung
von 10 ml Urin
ROESENER (36): Keine Angabe

In Ermangelung größerer Mengen an Reinsubstanz wurde die Nachweisempfindlichkeit zunächst nur am Verfahren nach VON MEYER überprüft. Dazu wurden 100 ng THC-Carbonsäure zusammen mit 10 ml drogenfreiem Urin nach Vorschrift extrahiert, aufgereinigt und schließlich dünnschichtchromatographisch dargestellt. Im Durchlicht konnte auf der Standard-DC-Platte ein gerade noch sichtbarer pinkfarbener Fleck im zu erwartenden R_f -Bereich von ca. 0,33 ausgemacht werden. Um nun zumindest vergleichen zu können, wie sich die übrigen Verfahren in Bezug auf die angegebenen Werte der maximalen Nachweisempfindlichkeit verhalten, wurde die bereits beschriebene Testreihe mit sukzessiver Verdünnung des Testurins vorgenommen. Dabei wurde allerdings das Verfahren nach VINSON (41) nicht berücksichtigt, da es praktisch identisch ist mit dem Verfahren nach CANNABUSE (7) mit 2 ml Urineinsatz. Beim Verfahren nach CANNABUSE wurde die Variante mit 5 ml Urineinsatz gewählt, zweimal auch die Variante mit 2 ml Urineinsatz.

Die gewonnenen Extrakte wurden dabei auf einer HPTLC-Platte mit dem Fließmittel nach CANNABUSE entwickelt und mit Echtblausalz RR färbend dargestellt. Die Abbildung 7 zeigt, welche dünnschichtchromatographischen Ergebnisse mit dem Testurin erzielt wurden.

Alle vier Verfahren ergeben im erwarteten R_f -Bereich die für die THC-Carbonsäure typischen pinkfarbenen Bänder. Desweiteren läßt sich erkennen, daß, wie auch schon in mehreren vorausgegangenen Versuchen, das Verfahren nach VON MEYER (34) offensichtlich die beste Ausbeute an THC-Carbonsäure erzielt. Die drei anderen Verfahren liegen in ihrer Ausbeute deutlich darunter und untereinander verglichen etwa gleich. (Das auf der Abbildung zu sehende halbmondförmige Band beim Verfahren nach ROESENER (36) scheint ein Artefakt zu sein, entstanden durch nicht ganz genaues punktförmiges Auftragen des Extraktes auf die DC-Platte).

Zusätzlich zeigt sich auf der Abbildung auch die unterschiedliche Qualität der jeweiligen Aufreinigungsmethode, auch wenn dieser Aspekt bei Verwendung der HPTLC-Platte wegen der Konzentrierungszone, die den größten Teil der Verunreinigungen zurückhält, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Einsatz von Standard-DC-Platten allerdings bedarf eines gut gereinigten Extraktes. Den saubersten Extrakt ergibt das Verfahren nach WILLSON (45), einen relativ sauberen das Verfahren nach VON MEYER (34). Größere Verunreinigungen zeigen die Extrakte aus dem Verfahren nach ROESENER (36) und CANNABUSE (7), wobei beachtet werden sollte, daß letzteres Verfahren nur 5 ml Urineinsatz hat. Dementsprechend eignen sich diese beiden Verfahren, wie Abbildung 11 für das Verfahren CANNABUSE (7) zeigt, nur bedingt für die Verwendung von Standard-DC-Platten, da auch durch die Wahl eines geeigneten Fließmittels die Verunreinigungen nicht in einem Bereich außerhalb des zu erwartenden R_f -Wertes plaziert werden können. Die Untersuchung mit geringerem Anteil an THC-Carbonsäure wurde damit begonnen, je ein Teil Testurin und ein Teil Leerurin zu mischen und dieses Gemisch wiederum aufzuarbeiten. Im Prinzip wurden die gleichen Ergebnisse erreicht.

wie mit dem Testurin alleine, jedoch waren die dabei erzielten Flecke entsprechend weniger kräftig. Die hier auch überprüfte CANNABUSE-Variante mit 2 ml Urineinsatz ergab noch einen, wenn auch schwach sichtbaren, Fleck auf dem Chromatogramm. Die nächste Verdünnungsstufe beinhaltete ein Teil Testurin und vier Teile Leerurin. Das Chromatogramm zeigte beim Verfahren nach VON MEYER (34) wiederum den vergleichsweise stärksten Fleck, bei der CANNABUSE-Variante mit 2 ml Urineinsatz konnte auch im Durchlicht ein THC-spezifischer Fleck nicht mehr gefunden werden. Die übrigen drei Verfahren erbrachten gerade noch sichtbare Flecke. Die Angaben der Autoren CANNABUSE (7) bzw. VINSON (41), daß diese mit 2 ml Urineinsatz eine Nachweisgrenze von 10 ng THC-COOH/ml Urin erreichen, konnte somit anhand der durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden.

Schließlich wurde der THC-haltige Testurin nochmals verdünnt (ein Teil Testurin, neun Teile Leerurin) lediglich das Verfahren nach VON MEYER (34) ergab einen, dem mit der Reinsubstanz durchgeführten Versuch ähnlich schwachen, aber gerade noch sichtbaren pinkfarbenen Fleck (Abb. 13).

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, daß die Verfahren mit dem C_2 -Säulen (WILLSON, ROESENER) die angegebene Nachweisempfindlichkeit von 20 ng THC-COOH/ml Urin erfüllen, ebenso das Verfahren mit der C_{18} -Säule (VON MEYER) mit der angegebenen Nachweisempfindlichkeit von 10 ng THC-COOH/ml Urin. Bei den Verfahren mit den XAD-2-Säulen (CANNABUSE, VINSON) konnte die angegebene Nachweisempfindlichkeit von 10 ng THC-COOH/ml Urin nicht annähernd bestätigt werden. Die Effizienz der XAD-2-Säulen, THC-Carbonsäure aus Urin zu extrahieren, korreliert in etwa mit der der C_{18} -Säule, gleiche Urinmenge vorausgesetzt.

Über eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute an THC-Carbonsäure zu optimieren, berichten GARRET und HUNT (13) bereits in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1974. Sie fanden in ihrer Untersuchung heraus, daß unbehandeltes Glas einen nicht unwesentlichen Anteil an gesuchter Substanz an ihre Oberfläche bindet. Demgegenüber wurde durch Einsatz von silikonisiertem Glas eine 20 - 40 Prozent höhere Ausbeute erzielt. Im Rahmen dieser Arbeit stand silikonisiertes Glas nicht zur Verfügung. Desweiteren wird erwähnt, daß Plastikartikel, z. B. die bei Verfahren CANNABUSE (7) zu benützenden Spitzen, eine noch höhere Absorption von THC-Carbonsäure an ihrer Oberfläche aufweisen als unbehandeltes Glas. Es darf vermutet werden, daß die angegebene Nachweisempfindlichkeit von 10 ng THC-COOH/ml Urin beim Verfahren nach CANNABUSE (7), die in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden konnte, mit Hilfe von silikonisiertem Glas erzielt wurde.

Die Wahl der Dünnschichtplatte stellt ein nicht unerhebliches Kriterium bezüglich des Ergebnisses auf dem Chromatogramm dar. VINSON et al. (41) stellten in ihren Untersuchungen zu Recht fest, daß High - Performance Dünnschichtplatten (HPTLC-Platten oder Nanoplatten) wesentlich dichtere Flecke bzw. Bänder liefern als Standard-DC-Platten. Diese Tatsache konnte bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche bestätigt werden, jeweils unter Verwendung des beim Verfahren nach CANNABUSE (7) angegebenen Fließmittels. Darüber hinaus liegt, wie bereits erwähnt, ein Vorteil der verwendeten HPTLC-Platten darin, im Eluat enthaltene unerwünschte Verunreinigungen fast vollständig in der Konzentrationszone zurückzuhalten. Die Entwicklung mit Hilfe von Standard-DC-Platten erbrachte bei der Wahl des geeigneten Fließmittels ebenfalls akzeptable Ergebnisse (vergleiche Abb. 11 und 12). Je nach verwendetem Fließmittel ergaben sich verschiedene Fleckformen, die alle von größerer Fläche als die auf

HPTLC-Platten erzielten Bänder waren. Die Qualität des Chromatogramms ist außerdem entscheidend abhängig von der vorangegangenen Aufreinigung, weil Verunreinigungen des Eluats bei den Standard-DC-Platten nicht oder nur teilweise auch im Bereich des jeweiligen R_f -Wertes der THC-Carbonsäure zu liegen kommen. Insgesamt verbessern HPTLC-Platten die Nachweisempfindlichkeit gegenüber Standard-DC-Platten erheblich, insbesondere beim Vorliegen sehr kleiner Mengen an THC-Carbonsäure im Urin.

Die Durchführung der einzelnen Verfahren dauerte bei zügigem Arbeiten etwa 2,5 bis 3 Stunden, lediglich das Verfahren nach WILLSON (45) mit seiner weitergehenden Aufreinigung beanspruchte etwa eine halbe Stunde mehr Zeitaufwand.

5.2. Vergleichende Untersuchung der bei den überprüften Verfahren angegebenen Fließmittel

Auf den entscheidenden Einfluß des jeweils gewählten Fließmittels wurde bereits verschiedentlich hingewiesen. Um die bei den fünf Verfahren angegebenen sieben Fließmittel miteinander vergleichen zu können, wurden sieben identische Extrakte mit Hilfe des neu entwickelten Verfahrens hergestellt. Die Extrakte wurden jeweils per Hand auf eine DC-Platte aufgetüpfelt, im jeweiligen Fließmittel entwickelt, mit Echtblausalz RR angefärbt und anschließend fotografiert. Die Ergebnisse sind auf den Abbildungen 8a - 8g dokumentiert. Die Extraktion mit dem neu entwickelten Verfahren wurde deshalb gewählt, um zum wiederholten Mal dessen Effizienz zu überprüfen und weil der Extrakt relativ sauber ist, in etwa vergleichbar mit dem aus dem Verfahren nach VON MEYER (34). Die Länge der Laufstrecken wurde auf 6,5 cm, jeweils vom Auftragspunkt aus gemessen, festgelegt. Typ der DC-Platte: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ der Firma MACHEREY-NAGEL.

Die Fließmittel im Einzelnen:

a) VON MEYER (34)

Zusammensetzung: Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung
70/30/2

Dauer: ca. 20 min. R_f -Wert: ca. 0,36

Form des Flecks: bumerangförmig oder oval

Leichte Verunreinigungen auf der gesamten Laufstrecke,
größter Teil der Verunreinigungen nahe dem Ende der
Laufstrecke (Abb. 8a)

b) CANNABUSE (7)

Zusammensetzung: Heptan/Ethylacetat/Eisessig 80/10/4

Dauer: ca. 12 min. R_f -Wert: ca. 0,08

Form des Flecks: schmales Band

Verunreinigungen größtenteils am Rand des Auftragspunktes,
reichen aber wegen des niedrigen R_f -Wertes in den
Bereich des Flecks (Abb. 8b).

c) VINSON (41)

Zusammensetzung: Heptan/Ethylether/Eisessig 80/10/4

Dauer: ca. 12 min. R_f -Wert: ca. 0,05

Form des Flecks: breites Band

Verunreinigungen größtenteils am Rand des Auftragspunktes,
der Fleck liegt wegen des sehr niedrigen
 R_f -Wertes teilweise in diesem Rand (Abb. 8c).

d) WILLSON (45)

Zusammensetzung: Ethylacetat/Methanol/Wasser/konz.
Ammoniumhydroxid 60/25/2,5/5

Dauer: ca. 18 min. R_f -Wert: ca. 0,36

Form des Flecks: quadratisch

Starke Verunreinigungen auf der gesamten Laufstrecke.
Fleck im R_f -Bereich kaum zu sehen. Dieses Fließmittel
bedarf, um ein akzeptables Ergebnis zu erreichen, der
in der Originalvorschrift angegebenen Aufreinigung des
Extraktes (Abb. 8d).

e) ROESENER (1) (36)

Zusammensetzung: Petrolether/Ether/Essig 50/50/1

Dauer: ca. 10 min.

R_f -Wert: ca. 0,26

Form des Flecks: quadratisch

Verunreinigungen größtenteils am Auftragspunkt und auf den ersten zwei Dritteln der Laufstrecke, also auch im Bereich des R_f -Wertes (Abb. 8e).

f) ROESENER (2) (36)

Zusammensetzung: Benzol/Methanol/Ether/Ameisensäure
50/5/50/10

Dauer: ca. 15 min.

R_f -Wert: ca. 0,65

Form des Flecks: langgezogen rechteckig

Verunreinigungen auf den ersten zwei Dritteln der Laufstrecke, am stärksten im Bereich des R_f -Wertes (Abb. 8f).

g) ROESENER (3) (36)

Zusammensetzung: Diisopropylether/Ameisensäure/Wasser
90/7/3

Dauer: ca. 80 min. (bei 5 cm Laufstrecke abgebrochen)

R_f -Wert: ca. 0,86

Form des Flecks: rund

Verunreinigungen auf dem Fleck, sowie fast kreisförmig, rund um den Fleck (Abb 8g).

Der Vergleich der sieben Fließmittel auf der Standard-DC-Platte ergibt für dasjenige nach VON MEYER das beste Ergebnis, da die Trennleistung gut ist, der R_f -Wert genügend hoch, und Verunreinigungen das Chromatogramm nicht stören. Die Fließmittel nach CANNABUSE (7) und VINSON (41) ergeben ebenfalls kräftige Flecke, ihre niedrigen R_f -Werte und die am Auftragspunkt verbliebenen Verunreinigungen, trotz wesentlich besserer Aufreinigung als in der Originalvorschrift, lassen sie für die Standard-DC-Platte als

wenig geeignet erscheinen. Das Fließmittel nach WILLSON (45) bedarf unter allen Umständen der langwierigen Aufreinigungsprozedur des Extraktes, wie in der Originalvorschrift beschrieben, um ein akzeptables Chromatogramm zu erzielen. Dies konnte mit der in diesem Versuch angewandten Aufreinigung nicht erreicht werden. Der Fleck ist großflächig und dementsprechend wenig dicht. Bei den Fließmitteln nach ROESENER fällt auf, daß die Verunreinigungen jeweils in den Bereich des R_f -Wertes zu liegen kommen. Es wurde allerdings nicht nachgeprüft, ob das Eluat, das aus der Originalvorschrift gewonnen wird, von unterschiedlicher Zusammensetzung hinsichtlich mitgeschleppter Verunreinigung ist, welche dann nicht im Bereich des zu erwartenden R_f -Wertes erscheinen würden. Die Flecke bei den Fließmitteln (1) und (2) sind großflächig und wenig dicht, beim Fließmittel (3) klein und dicht. Die Entwicklung des Chromatogramms mit dem Fließmittel (3) wurde nach 80 Minuten und 5 cm Laufstrecke abgebrochen. Das langsame Steigen des Fließmittels hängt vermutlich mit dessen relativ hohem Gehalt an Wasser zusammen.

Die Fließmittel nach VON MEYER (34) und CANNABUSE (7) wurden auch mit HPTLC-Platten geprüft. Bei ersterem blieben die Verunreinigungen nicht in der Konzentrierungszone hängen, sondern wurden in den Bereich des R_f -Wertes mitgeschleppt. Letzteres hingegen ergab in den Kriterien Aufreinigung, Dichte des Flecks, R_f -Wert und Sauberkeit des Chromatogramms sehr gute Ergebnisse. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß bei Verwendung von Standard-DC-Platten das Fließmittel nach VON MEYER (34) das Fließmittel der Wahl ist, bei Verwendung von HPTLC-Platten dasjenige nach CANNABUSE (7). Dementsprechend wurde bei allen weiteren Abbildungen diese beiden Fließmittel verwendet.

5.3. Vergleichende Untersuchung des selbst entwickelten Verfahrens mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der in der Literatur beschriebenen Verfahren dienten als Vorgabe zur Entwicklung eines eigenen Verfahrens. Das Ziel war, mit der XAD - 2-Säule (aus der Vorschrift nach CANNABUSE (7)) die Nachweisempfindlichkeit und Sauberkeit des Verfahrens nach VON MEYER (34) zumindest zu erreichen.

Die verschiedenen Arbeitsschritte zur Erstellung dieses neuen Verfahrens wurden größtenteils aus den beiden oben erwähnten Verfahren übernommen und entsprechend kombiniert. Aus dem Verfahren nach VON MEYER (34) wurde übernommen: die Urinmenge, die Hydrolyse, teilweise die Waschvorschrift, das Elutionsmittel, je nach verwendeter DC-Platte das Fließmittel, die Detektionslösung. Aus dem Verfahren nach CANNABUSE (7) wurde übernommen: die Säulenkonditionierung mit der dort angegebenen Pufferlösung, die Extraktionssäule, teilweise die Waschvorschrift, zeitweise die Verwendung des MULTI-PREP- Spotters, je nach verwendeter DC-Platte das Fließmittel (Abb. 5 mit Standard-DC-Platte, Abb. 6 mit HPTLC-Platte).

Das Verfahren nach CANNABUSE (7) hatte gegenüber dem Verfahren nach VON MEYER (34), das sich in den vorangegangenen Untersuchungen als das Effizienteste herausgestellt hatte, mehrere Nachteile: Bereitstellung von mehr Equipment (MULTI-PREP-Spotter, Spitzen), geringere Nachweisempfindlichkeit, wenig saubere Eluate und bedingte Tauglichkeit des Eluates bei Verwendung von Standard-DC-Platten. Diese Nachteile wurden bei der Entwicklung des neuen Verfahrens gezielt angegangen und beseitigt.

Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Ergebnisse, die diese drei Verfahren (VON MEYER (34), CANNABUSE (7),

neues Verfahren) auf der HPTLC- bzw. Standard-DC-Platte erbringen. (Alle drei Verfahren wurden mit dem Testurin und den in den Originalvorschriften angegebenen Urinvolumina durchgeführt.)

Auf der HPTLC-Platte ist zu erkennen, daß beim Verfahren nach CANNABUSE (7), trotz 5 ml Urineinsatz, gegenüber den anderen beiden Verfahren ungleich höhere Verunreinigungen, die obendrein teilweise im zu erwartenden R_f -Bereich zu liegen kommen, mitgeschleppt wurden. Die Chromatogramme der beiden anderen Verfahren sind, auch im Bereich des R_f -Wertes, größtenteils frei von mitextrahierten, unerwünschten Begleitstoffen. Hinsichtlich der Ausbeute an THC-Carbonsäure wurde festgestellt, daß sie bei allen drei Verfahren gut ist, wenngleich die erzielten Flecke (Bänder) wegen der bei dieser Abbildung ungleichmäßig großen Auftragspunkte keine objektive Bewertung zulassen, welches Verfahren die beste Ausbeute bietet. Dieses Kriterium jedoch wurde anhand der bereits erwähnten Verdünnungsreihe überprüft. Während, wie beschrieben, das Verfahren nach CANNABUSE (7) bei einer Verdünnung des Testurins von 1 : 10 keinen THC-spezifischen Fleck mehr auf dem Chromatogramm aufwies, erbrachte das neu entwickelte Verfahren einen, dem Verfahren nach VON MEYER (34) ähnlich, ganz schwachen roten Fleck, wobei das Chromatogramm insgesamt etwas unsauberer ausfiel (Abb. 13). Es wurde festgestellt, daß hinsichtlich der entscheidenden Kriterien Ausbeute, Nachweisempfindlichkeit und Sauberkeit des Eluats ein dem nach VON MEYER (34) in etwa ebenbürtiges Verfahren entwickelt wurde. Diese geringfügigen Unterschiede sind allerdings nicht absolut zu werten, da die Ergebnisse in den mannigfach geführten Untersuchungen vielfach dem Einfluß der wechselnden Fertigungsqualitäten aller benutzten Extraktionssäulen unterliegen.

Der Vergleich der Chromatogramme bei Verwendung von Standard-DC-Platten (siehe Abbildung 11) und dem dafür

tauglichsten Fließmittel ergab ein ähnliches Ergebnis wie auf den HPTLC-Platten, d.h. höhere Ausbeute und sauberere Eluate beim Verfahren nach VON MEYER (34) und dem neuen Verfahren gegenüber dem Verfahren nach CANNABUSE (7).

Die Ergebnisse dieser Versuche wurden zwar nicht mit objektiven physikalischen Meßmethoden, wie z.B. Densitometrie ermittelt, aber das Vorhandensein eines THC-spezifischen Flecks oder von Verunreinigungen auf dem Chromatogramm konnte mit bloßem Auge eindeutig bestimmt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, daß das neuentwickelte Verfahren in Bezug auf die Nachweisempfindlichkeit dem Verfahren nach VON MEYER (34) etwa ebenbürtig, allen anderen Verfahren deutlich überlegen ist. Die Sauberkeit des Eluates ist vergleichbar mit der des Verfahrens nach VON MEYER (34).

Die Aufarbeitung von etwa einhundert EMIT-positiven Urinproben mit dem neu entwickelten Verfahren ergab in keinem einzigen Fall eine Interferenz mit anderen unbekannten Substanzen des Urins im Bereich des R_f -Wertes der THC-Carbonsäure. Diese Aussage deckt sich mit den Ausführungen von CANNABUSE (7) und VINSON (41), die etwa dreißig verschiedene, häufig gebrauchte Drogen und Suchstoffe dahingehend überprüften. Die Abbildung 5 zeigt zwei von fünf geprüften Urinen, bei denen außer der THC-Carbonsäure jeweils eine weitere, nicht identifizierte Substanz mitextrahiert wurde, welche aber in einem wesentlich höheren R_f -Bereich liegt. Wiederum wurde bei diesen Vergleichsuntersuchungen festgestellt, daß, gleiche Urinvolumina vorausgesetzt, die C_{18} -Säule und die XAD-2-Säule in ihrer Effizienz, THC-Carbonsäure aus dem Urin zu extrahieren, gleich sind, wohingegen die Ausbeute bei den C_2 -Säulen deutlich geringer ist.

5.4. Bewertung des neu entwickelten Verfahrens im Vergleich zu einem nicht-dünnschichtchromatographischen Verfahren

Aus forensischer Sicht ist es geboten, einen Nachweis von THC im Urin mit zwei unterschiedlichen Methoden zu führen. In einschlägigen Veröffentlichungen wird auf diese Notwendigkeit immer wieder hingewiesen. Im hiesigen Institut wird ein durch das EMII-Verfahren ermittelter, THC-positiver Befund durch ein dünnschichtchromatographisches Verfahren abgesichert. Das EMII-Verfahren eignet sich bekanntlich als schnelle und sehr empfindliche Screening-Methode, ist aber nicht streng substanzspezifisch. Demzufolge wurden alle THC-positiven Urine aus einem Zeitraum von einem Vierteljahr mit dem neu entwickelten Verfahren überprüft, zum einen, um einen Vergleich mit ähnlichen Untersuchungen anderer Autoren zu haben, zum anderen, um eventuelle Unregelmäßigkeiten bei der Prozedur zu erkennen und auszumerzen.

Das EMII-Verfahren enthält drei Kalibratoren. Der " negative calibrator " entspricht drogenfreiem Urin, der " low calibrator " entspricht Urin mit 20ng/ml Delta-8-THC-Carbonsäure, der " medium calibrator " entspricht Urin mit 75ng/ml Delta-8-THC-Carbonsäure. Anhand der mit den drei Kalibratoren ermittelten Extinktionsänderung wurde eine Standardkurve aufgestellt, wobei die jeweiligen THC-Konzentrationen auf der Abszisse in logarithmischen Schritten, die jeweiligen Extinktionswerte auf der Ordinate, aufgezeichnet wurden. Dabei ergab sich eine Kurve in Form einer Exponentialfunktion. Als Cut-off wird beim EMII-Verfahren der Extinktionswert des " low calibrator " festgelegt. Das heißt, alle Extinktionswerte gleich oder über dem " low calibrator " werden als THC-positiv, darunter liegende Werte als negativ eingestuft. Mit Hilfe der

erstellten Kurve kann anhand des jeweils ermittelten Extinktionswertes ein mittlerer Wert für die Konzentration an THC-Carbonsäure in der untersuchten Urinprobe gefunden werden. Ein mittlerer Wert deshalb, weil im Gegensatz zur Dünnschichtchromatographie außer der THC-Carbonsäure eine Reihe weiterer Cannabis-Metaboliten das Meßergebnis beim EMIT-Verfahren bestimmen.

Es wurde festgestellt, daß bei EMIT-Werten, die eine THC-Konzentration über 45 ng/ml Urin ergeben, eine hundertprozentige Bestätigung durch das neu entwickelte Dünnschichtverfahren erreicht werden konnte. Für den Bereich zwischen 20 und 45 ng/ml konnte die THC-Carbonsäure in etwa 60 % der untersuchten Urinproben mit dem Dünnschichtverfahren nachgewiesen werden. Aus den obengenannten Gründen kann natürlich nicht von einem 40 %igen Fehler ausgegangen werden, zumal auch immer wieder beobachtet wurde, daß die Größe der Extinktionsänderung beim EMIT-Verfahren nicht notwendigerweise mit der Größe des erzielten Flecks auf dem Chromatogramm korreliert. Es ergab sich des öfteren, daß kleine Extinktionsänderungen beim EMIT-Verfahren kräftige, große Extinktionsänderungen hingegen schwache Flecke auf dem Chromatogramm lieferten (Abb. 6).

6. DISKUSSION

=====

Mit der vorliegenden Arbeit sollten Methoden geprüft und entwickelt werden, die einen Nachweis für Cannabisinhaltsstoffe im Urin mittels Dünnschichtchromatographie gestatten.

Das Dünnschichtchromatographieverfahren besitzt einen sehr hohen Grad an Spezifität für die THC-Carbonsäure, im Gegensatz zu anderen gebräuchlichen Routineverfahren wie EMIT und RIA, die mit einem vertretbaren apparativen Aufwand eine hohe Empfindlichkeit für eine Reihe verschiedener Cannabinoide haben. Dies schließt aber nicht aus, daß, wenn dabei sehr hohe Dosen nicht-cannabinoider Substanzen vorliegen, diese als "cannabispositiv" erfaßt werden können. Die Verfasser der in dieser Arbeit überprüften DC-Verfahren geben an, daß Interferenzen mit nicht-cannabinoiden Stoffen nicht beobachtet wurden. Das wiederum bedeutet, daß dennoch nicht-cannabinoide Substanzen in den Säulen mitextrahiert wurden. Diese wurden aber durch die Aufreinigung aus der Säule bereits wieder entfernt, oder erschienen, wie in einem Fall demonstriert, auf dem Chromatogramm weit außerhalb des zu erwartenden R_f -Bereichs für die THC-Carbonsäure (Abb. 5). Auch bei den überprüften Urinproben von Patienten der ansässigen Drogentherapiezentren konnten in keinem Fall andere als cannabinoide Substanzen auf dem Chromatogramm beobachtet werden, obwohl vermutet werden darf, daß den Patienten teilweise Therapiemittel zur Entwöhnung verabreicht werden oder der eine oder andere Patient weiterhin alle möglichen Drogen, deren er habhaft wird, zu sich nimmt.

Im Vergleich zu fast allen anderen Arten von Verfahren, wie EMIT, Gaschromatographie, RIA oder HPLC, besitzen die beschriebenen Verfahren der Dünnschichtchromatographie

eine relativ geringe Empfindlichkeit. Cannabispositive Resultate bei definiertem THC-Gehalt von 10 ng/ml Urin bei Einsatz von 10 ml Urin konnten nur sehr schwer visuell verifiziert werden. Bekanntlich wird beim EMIT-Verfahren ein THC-Gehalt von über 20 ng/ml Urin als positiv gewertet. Eine Dünnschichtchromatographische Bestätigung mit den beiden effizientesten Verfahren (nach VON MEYER (7) und neu entwickeltes Verfahren) von EMIT-Werten knapp über 20 ng THC/ml Urin gelang zu etwa 30 Prozent, mit aufsteigenden EMIT-Werten erhöhte sich der Prozentsatz entsprechend, wobei bei EMIT-Werten über 50 ng THC/ml Urin eine hundertprozentige Bestätigung erzielt wurde. Eine Korrelation zwischen der Höhe des EMIT-Wertes und der Größe und Dichte des erzielten THC-spezifischen roten Flecks auf dem Chromatogramm konnte nicht ermittelt werden, da beim EMIT-Verfahren neben dem THC-COOH eine Reihe weiterer Cannabismetaboliten erfaßt werden, die zum Teil über noch längere Dauer ausgeschieden werden als THC-COOH.

Eine exakte Quantifizierung der THC-Carbonsäure auf dem Chromatogramm mit Hilfe densitometrischer Methoden wurde nicht vorgenommen. Dies erschien unmöglich, weil es nicht gelang, das Eluat so auf die Dünnschichtplatte aufzutragen, daß die Auftragsflecke der Proben und der jeweils mitlaufenden Vergleichsprobe von exakt gleicher Größe waren. Die nach der Entwicklung der Platte erzielten Flecke waren somit untereinander wegen ihrer, wenn auch leichten, Größenunterschiede nicht mehr densitometrisch zu vergleichen. Die Ergebnisse auf dem Chromatogramm wurden daher mit bloßem Auge in folgende sechs Kategorien eingestuft: negativ, sehr schwach positiv, schwach positiv, positiv, stark positiv, sehr stark positiv.

Die Problematik, die Intoxikation mit Cannabis zeitlich einzuordnen, wurde durch die vielfältigen Untersuchungen über Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von THC offenkundig. Diese Tatsache erschwerte des öfteren die Interpretation von Ergebnissen mit THC-positiven Urinproben. Urinproben, die von der Polizei zur Untersuchung eingeschickt wurden, wurden von den jeweiligen Probanden meist in den ersten Stunden nach der Intoxikation genommen. Die Untersuchung ergab in den allermeisten Fällen eine Korrelation der ermittelten EMIT-Werte mit denen auf dem Chromatogramm. Anders dagegen bei THC-positiven Urinen, die von Patienten der Drogenkliniken sporadisch entnommen wurden, zeigte es sich, da der Zeitpunkt des Konsums der Droge nicht ermittelt werden konnte, daß oft hohe EMIT-Werte mit den geprüften dünnschichtchromatographischen Verfahren kaum bestätigt werden konnten. Überraschenderweise wurden aber auch stark positive Ergebnisse auf dem Chromatogramm erzielt, wo sehr kleine Extinktionswerte aus dem EMIT-Verfahren dies nicht erwarten ließen (Abb. 6/S3). Es darf in diesem Zusammenhang vermutet werden, daß die Verteilung, der Metabolismus und die Ausscheidung von Cannabisinhaltsstoffen von Individuum zu Individuum mehr oder weniger stark verschieden ist. Dies kann einerseits im Habitus, speziell die Menge des Fettgewebes betreffend, wo eine Kumulation stattfinden kann, begründet sein, andererseits darin, daß bei längerem und häufigerem Konsum das jeweilige Individuum eine Variante des bislang bekannten Metabolismus ausbildet.

7. ZUSAMMENFASSUNG

=====

In der vorliegenden Arbeit wird über dünn-schichtchromatographische Verfahren zum Nachweis von Cannabisinhaltsstoffen im Urin berichtet. Entsprechende Verfahren, die vor fünf und mehr Jahren entwickelt wurden, werden dabei nur insofern geschildert, als sie den raschen Fortschritt in diesem Forschungsgebiet dokumentieren. Diese Verfahren arbeiten ausschließlich mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Den Hauptbestandteil dieser Arbeit bilden Untersuchungen neuester dünn-schichtchromatographischer Verfahren, sowie die Entwicklung eines neuen Verfahrens. All diese Verfahren bedienen sich der Extraktion mit Festphasen. Dabei wird die gesuchte Substanz an bestimmte Molekülgruppen gebunden und anschließend mit einem Lösungsmittel eluiert.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung im ersten Halbjahr 1985 waren in der einschlägigen Literatur fünf derartige Verfahren beschrieben. Sie wurden in allen ihren einzelnen Arbeitsschritten untersucht und untereinander verglichen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Verfahren als deren wichtigstes Kriterium wurde anhand von Verdünnungsreihen mit dem vorliegenden Testurin untersucht und gewertet. Bei einigen Verfahren konnte dabei die vom jeweiligen Verfasser angegebene Empfindlichkeit nicht bestätigt werden.

Die Entwicklung des eigenen, neuen Verfahrens wird detailliert beschrieben. Die einzige Vorgabe war dabei die Verwendung von XAD-2-Säulen. Die zur Durchführung des Verfahrens notwendigen Arbeitsschritte wurden, weil sie sich

in den bereits bekannten Verfahren bewährt hatten, entweder aus diesen übernommen oder je nach Bedarf kombiniert und modifiziert. Ein Vergleich des neuen Verfahrens mit den bereits bekannten ergab, daß dieses in ihrer Effizienz dem als dem am empfindlichsten ermittelten bekannten Verfahren vergleichbar ist. Die untersuchten dünnschicht-chromatographischen Verfahren dienen in aller Regel dazu, cannabispositive Befunde andersartiger Untersuchungsmethoden, wie z.B. dem EMIT-Verfahren, abzusichern. Die dabei nicht immer übereinstimmenden Ergebnisse erfuhren eine kritische Würdigung.

Zur Dokumentation der Untersuchungen und ihrer Ergebnisse wurden Photographien angefertigt. Desweiteren wurden die Arbeitsvorschriften der fünf in der Literatur angegebenen Methoden zur besseren Übersicht in einheitlicher Form gegliedert.

8. ANHANG

=====

8.1. Arbeitsvorschriften

VORSCHRIFT ZUR THC-DÜNN SCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Verfahren nach **VON MEYER** (Institut für Rechtsmedizin der
Ludwig-Maximilian-Universität,
München)

Hilfsmittel

Vakuumgerät (BAKER-10 Extraktionssystem)

BAKER SPE Octadecyl-Säulen (C₁₈)

BAKER Probensammelgläser (2 ml)

BAKER Filtersäulen 6 ml

Aceton

Ammoniaklösung 25 %

Chloroform

Echtblausalz RR

Essigsäure 96 %

10 %ige methanolische KOH-Lösung

Methanol

5 % NaHCO₃-Lösung

Probenvorbereitung (Hydrolyse und pH-Einstellung)

10 ml Urin und 3 ml KOH-Lösung 12 min. bei 100°C erhitzen,
abkühlen lassen, dann 5 ml Essigsäure zugeben (ca. pH
3,5).

Säulenvorbereitung (Säulenkonditionierung)

Filtersäule mit Hilfe des gelben Adapters auf die C₁₈-
Säule setzen. Zweimal 3 ml Methanol, anschließend zweimal
3 ml H₂O durch beide Säulen durchsaugen. Vakuum abschal-
ten, Säulenfüllung der C₁₈-Säule darf nicht trocken wer-
den.

Probenaufgabe

Probe durch Filtersäule und C₁₈-Säule bei Vakuum 5" Hg vollständig durchsaugen und dann Filtersäule entfernen.

Säulenwäsche

Verbliebene C₁₈-Säule nacheinander mit jeweils 1 ml H₂O, NaHCO₃-Lösung und H₂O durchspülen bei Vakuum 5" Hg. Danach Vakuum ausschalten.

Mit 50 Mikroliter Aceton die an den Wänden der Säule verbliebene Flüssigkeit abspülen.

Vakuum dann wieder einschalten und bei mindestens 15" Hg Vakuum mindestens 5 min. die Säule trockensaugen.

Danach Vakuum abstellen, Stahlnadeln am Deckel des Vakuumgerätes mit Zellstoff trocknen und säubern.

Elution und Auftragen auf Dünnschichtplatte

Probensammler-Rack mit Probensammelgläsern in Baker-10 Extraktionssystem einsetzen. Deckel mit C₁₈-Säule aufsetzen. 200 Mikroliter Aceton aufgeben, Vakuum auf 5" Hg einstellen, durchsaugen, diesen Vorgang wiederholen.

Eluat unter Vakuum bis zur Trockne einengen.

Rückstand mit 10 Mikroliter Methanol aufnehmen und auf DC-Platte auftupfen, diesen Vorgang wiederholen.

Laufstrecke (ca. 6,5 cm) auf DC-Platte aufzeichnen.

Dünnschichtauftrennung

DC-Platte in gesättigter Kammer mit folgendem Fließmittel entwickeln: Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung 25 % 70/30/2

Nach Erreichen des Endes der Laufstrecke DC-Platte aus der Kammer entnehmen und gut trocknen.

Detektion

DC-Platte besprühen mit frisch bereiteter 0,5 %iger Lösung von Echtblausalz RR in Methanol/Wasser (50 : 50).

DC-Platte gut trocknen.

THC-Carbonsäure erscheint als rosa bis kirschroter ovaler Fleck bei R_f von 0,30 - 0,35.

VORSCHRIFT ZUR TLC-DÜNNSCHICHELCHROMATOGRAPHIE

Verfahren **CANNABUS I** der Fa. Biochemical Diagnostics,
Farmingdale, U.S.A.

Hilfsmittel

Vakuumgerät

AMBI RITE XAD-2 Säulen

Essigsäure 96 %

Methanol

0,2 M Acetat-Puffer pH 4 mit 7 % Säulenaktivator

Kieselgurspitzen

7 N KOH-Lösung

Heptan

Ethylacetat: Isopropanol (85 : 15)

Echtblausalz BB

MULTI-PREP TLC-Spotter

Probenvorbereitung (Hydrolyse und pH-Einstellung)

5 ml (2 ml) Urin und 1,0 ml (0,4 ml) KOH-Lösung 20 min. bei 60°C erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Danach 1,0 ml (0,4 ml) Essigsäure zugeben (ca. pH 4).

Säulenvorbereitung

Säule in Vakuumgerät einsetzen. (Bei 2 ml Urinmenge obere Watte bereits jetzt entfernen).

Probenaufgabe (Säulenkonditionierung und Extraktion)

In die Säule werden 5 ml Acetat-Puffer pipettiert, dann der Urin aufgegeben. Vakuum einschalten und auf 2-3" Hg einpegeln. Probe vollständig durchsaugen. Danach die obere Watte entfernen (bei 5 ml Urinmenge).

Säulenwäsche

10 ml (4 ml) 50 %ige Methanol-Lösung in die Säule geben und bei Vakuum 2-3" Hg durchsaugen. Danach mit mindestens Vakuum 15" Hg die Säule mindestens 5 min. trockensaugen. Danach Säule aus Vakuumgerät entfernen.

Elution und Auftragen auf Dünnschichtplatte

Länge der Laufstrecke (ca. 6,5 cm vom unteren Rand der Konzentrierungszone aus gemessen) aufzeichnen. DC-Platte auf TLC-Spotter legen, diesen auf 90°C einstellen und Kieselgurspitzen einsetzen. Säule in Gestelle einsetzen und 1,7 ml Elutionslösung (Ethylacetat: Isopropanol) in die Säule aufgeben. Elutionslösung fließt durch Schwerkraft in und durch die Kieselgurspitze auf die DC-Platte. Danach DC-Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Dünnschichtauftrennung

DC-Platte in gesättigter Kammer mit folgendem Fließmittel entwickeln: Heptan/ Ethylacetat/ Essigsäure 80/10/4.

Nach Erreichen des Endes der Laufstrecke DC-Platte aus der Kammer entnehmen, kurz mit heißer Luft und dann auf TLC-Spotter bei 90°C 5 min. trocknen.

Detektion

DC-Platte in Kammer eintauchen oder mit 0,3 % wässriger Lösung von Echtblausalz BB besprühen. Danach DC-Platte bei 75°C auf TLC-Spotter trocknen.

THC-Carbonsäure erscheint als rosarotes Band bei R_f von ca. 0,35 vom Auftragspunkt aus gemessen.

Anmerkung: Bei Einsatz von 2 ml Urin werden DC-Platten, Fabrikat Whatman, Typ LHP-K HPTLC mit Konzentrierungszone, bei Einsatz von 5 ml Urin welche des gleichen Fabrikats, Typ LK6D TLC empfohlen.

VORSCHRIFT ZUR THC-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Verfahren nach **VINSON** und

LOPATOFISKY, Department of Chemistry,
University of Scranton,
Scranton, U.S.A.

Hilfsmittel

Vakuumgerät

AMBERLITE XAD-2 Säulen

Essigsäure 96 %

Methanol

0,2 M Acetat-Puffer pH 4 mit 7 % n-Propanol

6 M NaOH-Lösung

MULTI-PREP TLC-Spotter

Ethylacetat-Isopropanol (85:15)

Heptan

Ethylether

Echtblausalz BB

Kieselgurspitzen

Probenvorbereitung (Hydrolyse und pH-Einstellung)

Urin auf Raumtemperatur bringen, dann 1 min. in Ultraschallbad geben. 2 ml Urin und 0,2 ml NaOH-Lösung 20 min. bei 60 °C erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Danach 0,3 ml Essigsäure zugeben (ca. pH 4).

Säulenvorbereitung

Säule in Vakuumgerät einsetzen, obere Watte entfernen.

Probenaufgabe (Säulenkonditionierung und Extraktion)

In die Säule werden 5 ml Acetat-Puffer pipettiert, dann der Urin aufgegeben, Vakuum einschalten und auf 2 - 3" Hg einpegeln. Probe vollständig durchsaugen.

Säulenwäsche

5 ml 50 %ige Methanol-Lösung in die Säule geben und bei Vakuum 2 - 3" Hg durchsaugen. Danach mit mindestens Vakuum 15" Hg die Säule 5 min. trockensaugen. Danach Säule aus Vakuumgerät entfernen.

Elution und Auftragen auf Dünnschichtplatte

Länge der Laufstrecke (ca. 6 cm vom unteren Rand der Konzentrierungszone aus gemessen) aufzeichnen. DC-Platte auf TLC-Spotter legen, diesen auf 90°C einstellen und Kieselgurspitzen einsetzen. Säule in Gestell einsetzen und 1,7ml Elutionslösung (Ethylacetat:Isopropanol) in die Säule aufgeben. Elutionslösung fließt durch Schwerkraft in und durch die Kieselgurspitze auf die DC-Platte. Danach DC-Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Dünnschichtauftrennung

DC-Platte in gesättigter Kammer mit folgendem Fließmittel entwickeln: Heptan/ Ethylether/ Essigsäure 80/10/4

Nach Erreichen des Endes der Laufstrecke (ca. 15 - 20 min.) DC-Platte aus der Kammer entnehmen und auf TLC - Spotter bei 90°C 5 min trocknen.

Detektion

DC-Platte eintauchen in Kammer mit frisch bereiteter 0,3 %iger Lösung von Echtblausalz BB. Danach DC-Platte bei 75°C auf TLC-Spotter trocknen.

THC-Carbonsäure erscheint als rosarotes Band bei R_f von 0,32 - 0,34 vom Auftragspunkt aus gemessen.

1. Anmerkung: Es wird die Verwendung von DC-Platten des Fabrikats Whatman, Typ Regular Phase HPTLC plate mit Konzentrierungszone empfohlen.

2. Anmerkung: Dieses Verfahren entspricht in Bezug auf Verwendung der gleichen Extraktionssäulen, Säulenkonditionierung, Extraktion, Säulenwäsche, Elution, Auftragen auf Dünnschichtplatte und Detektion dem CANNABUSE-Verfahren der Firma Biochemical Diagnostics, Inc. Farmingdale U.S.A.

VORSCHRIFT ZUR THC-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Verfahren nach **WILLSON, KOGAN, PIERSON** und **NEWMAN**, Dept. of Neuropathology and Neurotoxicology, New York State Psychiatric Institut and Div. of Neuropathology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University New York, U.S.A.

Hilfsmittel

Vakuumgerät (BAKER-10 Extraktionssystem)

BOND ELUT - Säulen (THC oder C₂)

Konz. Salzsäure

Methanol

0,1 M Salzsäure

Aceton

Dichlormethan

Hexan

10 M NaOH - Lösung

Acetonitril: 50 mM Phosphorsäure (1:9)

Ethylacetat

Konz. Ammoniumhydroxid

Probenvorbereitung (Hydrolyse und pH-Einstellung)

10 ml Urin und 0,9 ml der NaOH-Lösung 15 min. bei 100° C erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Danach ca. 0,7 ml konz. Salzsäure zugeben (ca. pH 1-3).

Säulenvorbereitung (Säulenkonditionierung)

Säule in Vakuumgerät einsetzen. Jeweils 4 ml Methanol, H₂O, Methanol, H₂O durch die Säule durchsaugen. Vakuum abschalten. Säulenfüllung darf nicht trocken werden.

Probenaufgabe (Extraktion)

Probe durch Säule bei Vakuum 5" Hg vollständig durchsaugen

Säulenwäsche

Nacheinander 10 ml 0,1 M Salzsäure, dann 25 ml Acetonitril : 50 mM Phosphorsäure (1:9) in die Säule geben und bei Vakuum 5" Hg durchsaugen. Stahladeln am Deckel des Vakuumgerätes mit Zellstoff trocknen und säubern.

Elution

Mit 1 ml Aceton eluieren, Eluat in Glasröhrchen auffangen.

Nochmalige Aufreinigung

In das Glasröhrchen mit dem Eluat 0,5 ml Dichlormethan aufgeben, den Inhalt kurz auf den Rüttler geben. Anschließend wird der Inhalt zentrifugiert (ca. 5 min. bei $3500 \times g$). Die obere Phase wird abpipettiert und verworfen und zur übriggebliebenen Phase wird 0,5 ml Hexan zugegeben. Inhalt wird wieder gerüttelt und zentrifugiert wie oben angegeben. Die obere Phase wird in ein anderes Glasröhrchen pipettiert, wobei ein kleiner Wassertropfen im ersten Glasröhrchen zurückbleiben muß. Das Eluat wird im Stickstrom bei 60°C zur Trockne eingedampft.

Auflagen auf Dünnschichtplatte

Rückstand wird mit ca. 10 Mikroliter Aceton gelöst, mit einem Kapillarröhrchen aufgenommen und auf die DC-Platte aufgetupft. Laufstrecke (ca. 6,5 cm) auf DC-Platte aufzeichnen.

Dünnschichtauftrennung

DC-Platte in gesättigter Kammer mit folgendem ¹Fließmittel entwickeln: Ethylacetat/ Methanol/ H_2O / Konz. Ammoniumhydroxid-Lösung 12/5/0,5/1.

Nach Erreichen des Endes der Laufstrecke die DC-Platte aus der Kammer entnehmen und trocknen.

Detektion

DC-Platte besprühen mit frisch bereiteter 0,5 %iger Lösung von Echtblausalz RR in Wasser/ Methanol (50:50). DC - Platte trocknen.

THC-Carbonsäure erscheint als roter Fleck bei R_f von 0,43 - 0,50.

Anmerkung: Dieses Verfahren entspricht im Bezug auf Verwendung der gleichen Extraktionssäulen und Säulenwäsche dem von Mahmoud ElSohly et al. in Zusammenarbeit mit der Firma Analytichem International, Harbour City, California, U.S.A., entwickelten Verfahren zur Analyse von THC-Carbonsäure durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

VORSCHRIFT ZUR THC-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Verfahren nach **ROESENER**, Hagen

Hilfsmittel

Vakuumgerät

BOND ELUT-Säulen (THC oder C₂)

Methanol

0,1 N Salzsäure

10 N KOH-Lösung

Konz. Salzsäure

Acetonitril: 50 mM Phosphorsäure (1:9)

Acetonitril

2 N NaOH-Lösung

Echtblausalz B bzw. RR

verschiedene Reagenzien zur Herstellung der empfohlenen
Fließmittel siehe unter Dünnschichtauftrennung.

Probenvorbereitung (Hydrolyse und pH-Einstellung)

10 ml Urin und 2 ml der KOH-Lösung 15 min. bei 50°C erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Danach mit Konz. Salzsäure einen pH von 5 - 6 einstellen.

Säulenvorbereitung (Säulenkonditionierung)

Säule in Vakuumgerät einsetzen. Jeweils 4 ml Methanol, H₂O, 0,1 N Salzsäure, H₂O durch die Säule durchsaugen, Säulenfüllung darf nicht trocken werden.

Probenaufgabe (Extraktion)

Probe bei Vakuum 5" Hg vollständig durch die Säule saugen.
(Keine Angabe über Stärke des Vakuums, erfahrungsgemäß 5" Hg empfehlenswert).

Säulenwäsche

Erst 10 ml 0,1 N Salzsäure, dann 25 ml Acetonitril: 50 mM Phosphorsäure (1:9) jeweils vollständig durch die Säule

durchsaugen. (Keine Angabe über Stärke des Vakuums und ob die Säule trockengesaugt werden soll. Nach meinen Erfahrungen sollte man vor dem Trockensaugen sogar 50 Mikroliter Aceton in die Säule geben, um später beim Eindampfen des Elutionsmittels nicht unnötig lange auch noch Wasser abblasen zu müssen, welches die Platte beschädigen würde.

Elution und Auftragen auf Dünnschichtplatte

Mit 1,5 ml Acetonitril eluieren, Eluat in Glasröhrchen auffangen. Eluat im Stickstrom abblasen.

Rückstand mit 20 - 30 Mikroliter Methanol aufnehmen und strichförmig auf DC-Platte auftupfeln. Laufstrecke (ca. 6,5 cm) auf DC-Platte aufzeichnen.

Dünnschichtauftrennung

DC-Platte in gesättigter Kammer mit folgenden Fließmitteln entwickeln:

1. Petrolether/ Ether/ Essigsäure 96 % 50/50/1 oder
2. Benzol/ Methanol/ Ether/ Ameisensäure 50/5/50/10 oder
3. Diisopropylether/ Ameisensäure/ Wasser 90/7/3

Nach Erreichen des Endes der Laufstrecke die DC-Platte aus der Kammer entnehmen und trocknen.

Detektion

DC-Platte besprühen mit frisch bereiteter 0,5 %iger Lösung von Echtblausalz B bzw. RR in Wasser/ Methanol (50:50). DC-Platte trocknen. Nachsprühen mit NaOH-Lösung.

THC-Carbonsäure erscheint als rosa Fleck bei R_f von 0,80 bei Fließmittel Nr. 3. '

Anmerkung: Dieses Verfahren entspricht in Bezug auf Hydrolyse, pH-Einstellung, Verwendung der gleichen Extraktionssäulen, Säulenwäsche und Elution dem von Mahmoud A. ELSohly et al. in Zusammenarbeit mit der Firma Analytichem International, Harbour City, California, U.S.A. entwickelten Verfahren zur Analyse von THC-Carbonsäure durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

VORSCHRIFT ZUR THC-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Verfahren nach **VON MEYER** und

HEFELE

(Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilian-
Universität, München)

Hilfsmittel

Vakuumgerät

AMBERLITE XAD-2 Säulen

Essigsäure 96 %

Ammoniaklösung 25 %

Methanol

0,2 M Acetat-Puffer pH 4 mit 7 % n-Propanol

10 %ige methanolische KOH-Lösung

Aceton

Chloroform

Echthlausalz RR

5 %ige NaHCO_3 -Lösung

MULTI-PREP TLC-Spotter

Kieselgurspitzen

Probenvorbereitung (Hydrolyse und pH-Einstellung)

10 ml Urin und 3 ml der KOH-Lösung 12 min. bei 100°C erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Danach 3 ml Essigsäure zugeben (ca. pH 4).

Säulenvorbereitung

Säule in Vakuumgerät einsetzen.

Probenaufgabe (Säulenkonditionierung und Extraktion)

In die Säule werden 5 ml Acetat-Puffer pipettiert, dann den Urin aufgeben. Vakuum einschalten und auf 3 - 4" Hg ein pegeln. Probe vollständig durchsaugen und dann die obere Watte entfernen.

Säulenwäsche

Nacheinander mit jeweils 5 ml H_2O , $NaHCO_3$ -Lösung und H_2O , anschließend mit 10 ml 50 %iger Methanol-Lösung die Säule bei Vakuum 5" Hg durchspülen. Vakuum dann abschalten.

Mit 75 Mikroliter Aceton die an den Wänden der Säule verbliebene Flüssigkeit abspülen.

Vakuum dann wieder einschalten und bei mindestens 15" Hg Vakuum mindestens 5 min. die Säule trockensaugen.

Danach Vakuum abschalten und Säule aus Vakuumgerät entnehmen.

Elution und Auftragen auf Dünnschichtplatte

Startpunkt und Länge der Laufstrecke (ca. 6,5 cm) auf DC-Platte aufzeichnen. DC-Platte auf TLC-Spotter legen, diesen auf 90°C einstellen und Kieselgurspitzen einsetzen. Säule in Gestell einsetzen und 1,7 ml Aceton in die Säule aufgeben. Aceton fließt durch Schwerkraft in und durch die Kieselgurspitze auf die DC-Platte.

Alternative Methode, wenn kein TLC-Spotter zur Verfügung steht:

Wiederum mit 1,7 ml Aceton eluieren, Eluat in Probensammelgläsern auffangen. Eluat zur Trockne einengen. Rückstand mit 10 Mikroliter Methanol aufnehmen und auf DC - Platte auftupfen; Vorgang wiederholen.

Dünnschichtauftrennung

DC-Platte in gesättigter Kammer mit folgendem Fließmittel entwickeln: Chloroform/ Methanol/ Ammoniaklösung 25 % 70/ 30/2. Nach Erreichen des Endes der Laufstrecke DC-Platte aus der Kammer entnehmen und gut trocknen.

Detektion

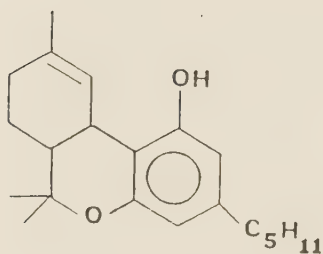
DC-Platte mit frisch bereiteter 0,5 %iger Lösung von Echtblausalz RR in Methanol/ H_2O (50:50) besprühen.

DC-Platte gut trocknen.

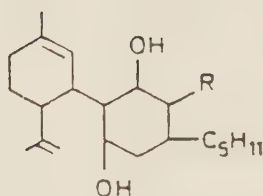
THC-Carbonsäure erscheint als rosa bis kirschroter, ovaler Fleck bei R_f von 0,30 - 0,35.

8.2. Abbildungen

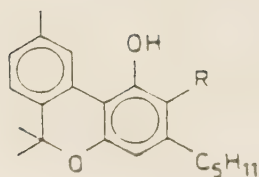
Abb. 1



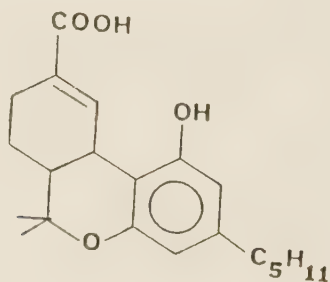
Delta-9-Tetrahydrocannabinol



Cannabidiol



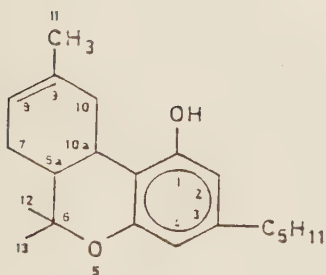
Cannabinol



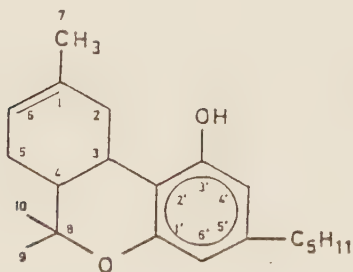
Delta-9-Tetrahydrocannabinol-
11-Carbonsäure

Abb. 2

Delta-9-Tetrahydrocannabinol

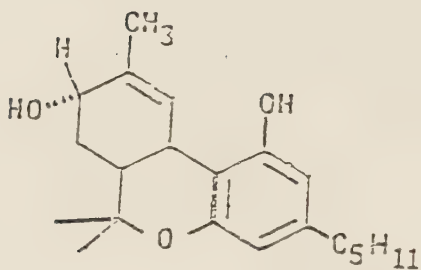


Dibenzopyran-Nomenklatur
(JUPAC)

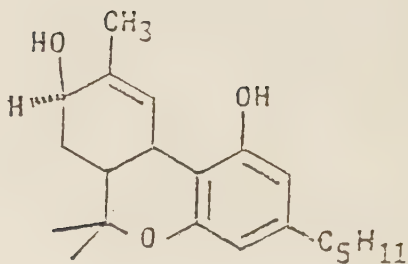


Monoterpenoid-Nomenklatur

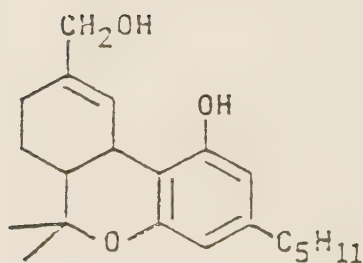
Abb. 3



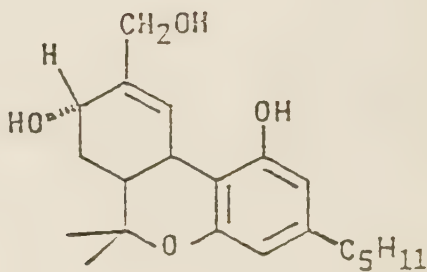
8- α -Hydroxy- δ -9-THC



8- β -Hydroxy- δ -9-THC

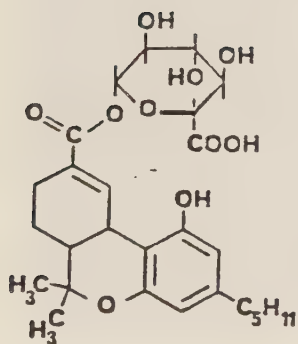


11-Hydroxy- δ -9-THC



8- α -11-Dihydroxy- δ -9-THC

Abb. 4



Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure-Glukuronid

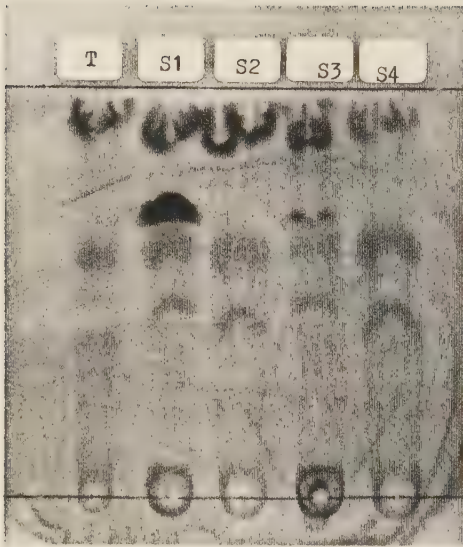


Abb. 5

Standard DC-Platte

Neues Verfahren

Verschiedene Urine

T: Testurin

S1 - S4: THC-positive Urine (EMIT-positiv und DC-positiv)

EMIT-Werte:

T: 64 über low calibrator

S1: 48 " " "

S2: 60 " " "

S3: 61 " " "

S4: 69 " " "

S1 und S3: unbekannte, mitextrahierte Substanz bei R_f -Wert ca. 0,75

R_f -Werte: ca. 0,40

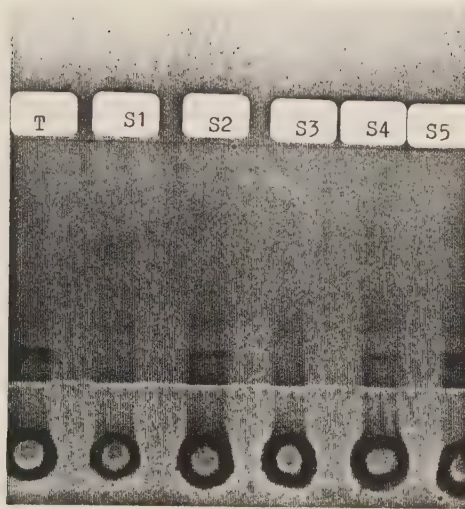


Abb. 6

HPTLC-Platte (Nanoplatte)

Neues Verfahren

Verschiedene Urine

T: Testurin

S1: THC-negativer Urin (EMIT-negativ und DC-negativ)

S2 - S5: THC-positive Urine (EMIT-positiv und DC-positiv)

EMIT-Werte:

T: 64 Über low calibrator

S2: 55 " " "

S3: 4 " " "

S4: 59 " " "

S5: 61 " " "

R_f -Werte: ca. 0,35

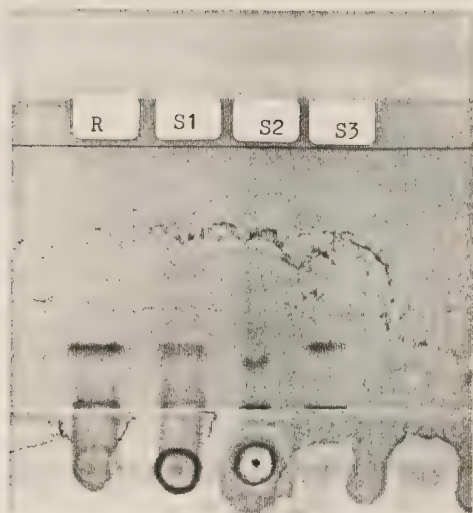


Abb. 7

HPTLC-Platte (Nanoplatte)

Fließmittel nach CANNABUSE

Testurin

R: Referenzverfahren nach VON MEYER

S1: Verfahren nach CANNABUSE

S2: Verfahren nach ROESENER

S3: Verfahren nach WILLSON

R_f -Werte: ca. 0,35

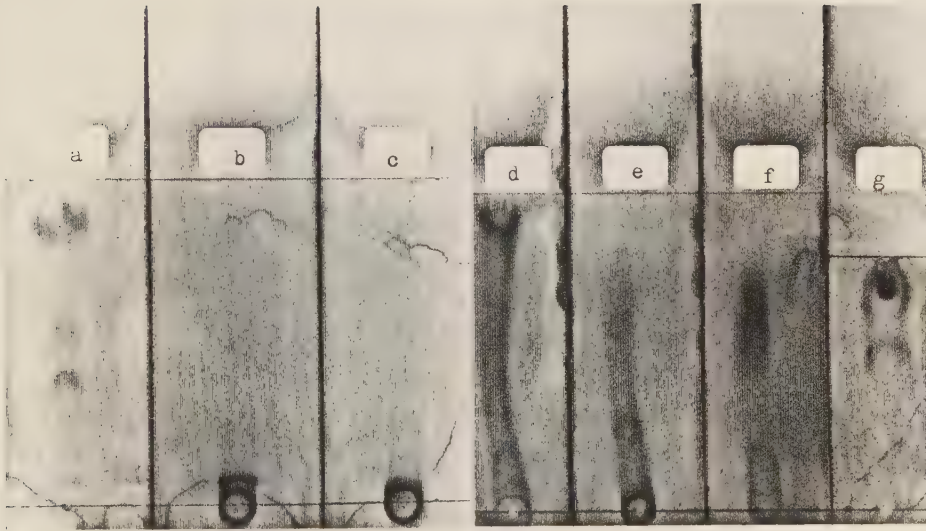


Abb. 8a - g

Standard DC-Platte

Aufbereitung der Extrakte nach dem neuen Verfahren
Testurin

Fließmittel nach	R_f -Wert
a: VON MEYER	0,36
b: CANNABUSE	0,08
c: VINSON	0,05
d: WILLSON	0,36
e: ROESENER (1)	0,26
f: ROESENER (2)	0,65
g: ROESENER (3)	0,86

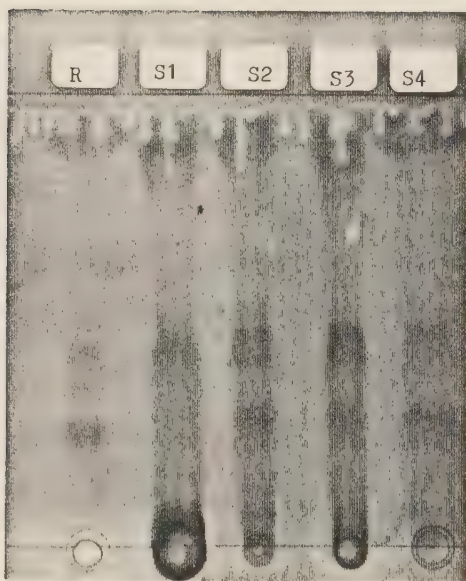


Abb. 9

Wege zum neuen Verfahren

Standard-DC-Platte

Fließmittel nach VON MEYER

R: Referenzverfahren nach VON MEYER

S1 - S4: verschiedene Aufreinigungsarten (Waschvorschriften)
beim neuen Verfahren

S1: je 10 ml $H_2O/NaHCO_3$ -Lösung/ H_2O

S2: 20 ml Methanol-Lösung

S3: je 20 ml $H_2O/NaHCO_3$ -Lösung/ H_2O

S4: 40 ml Methanol-Lösung

R_f -Werte: ca. 0,30

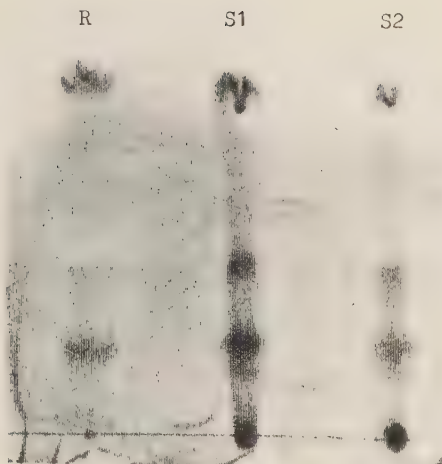


Abb. 10

Wege zum neuen Verfahren

Standard-DC-Platte

Fließmittel nach VON MEYER

Testurin

R: Referenzverfahren nach VON MEYER

S1 und S2: verschiedene Aufreinigungsarten (Waschvorschriften)
beim neuen Verfahren

S1: je 5 ml $H_2O/NaHCO_3$ -Lösung/ $H_2O/10$ ml Methanol-Lösung

S2: 10 ml Methanol-Lösung/je 5 ml $H_2O/NaHCO_3$ -Lösung/ H_2O

R_f -Werte: ca. 0,30

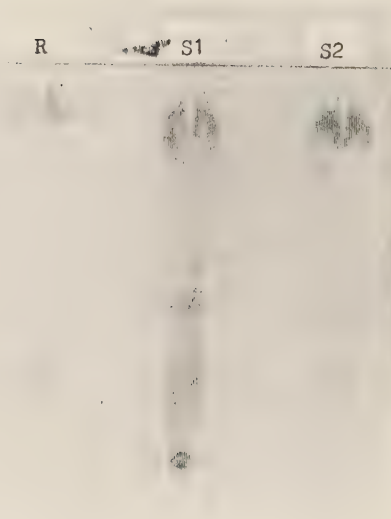


Abb. 11

Standard-DC-Platte

Fließmittel nach VON MEYER

Testurin

R: Referenzverfahren nach VON MEYER

S1: CANNABUSE

S2: Neues Verfahren

R_f-Werte: ca. 0,28

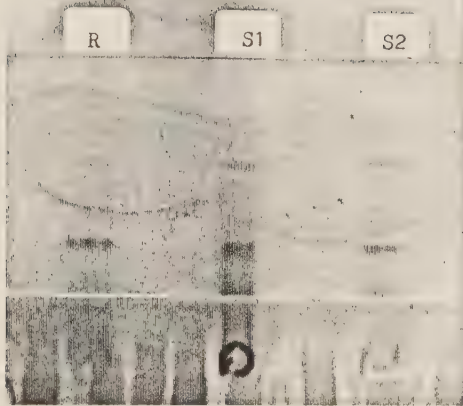


Abb. 12

HPTLC-Platte (Nanoplatte)

Fließmittel nach CANNABUSE

Testurin

R: Referenzverfahren nach VON MEYER

S1: CANNABUSE

S2: Neues Verfahren

R_f Werte: ca. 0,35



Abb. 13

HPTLC-Platte (Nanoplatte)
Fließmittel nach CANNABUSE
Testurin auf 1:10 verdünnt

R: Referenzverfahren nach VON MEYER
S1: CANNABUSE
S2: Neues Verfahren

R_f -Werte: ca. 0,38

9. LITERATURVERZEICHNIS

=====

1. Agurell, S., Gustafsson, B., Holmstedt, B., Leander, K., Lindgren, J.-E., Nilsson, I., Sandberg, F. und Asberg, M., Quantitation of Delta-1-Tetrahydrocannabinol in plasma from cannabis smokers. J. Pharm. Pharmacol. 25, 554 - 558 (1973)
2. Agurell, S., Nilsson, I.M., Ohlsson, A. und Sandberg, F., Elimination of tritium-labelled cannabinoids in the rat with special reference to the development of tests for the identification of cannabis users. J. Biochem. Pharmacol. 18, 1195 - 1201, (1969)
3. ANALYTICHEM INTERNATIONAL, Solid Extraction Columns, Beipackzettel der BOND-ELUT-Säulen
4. Arnold, W., Cannabis, In: Graf, E. und Preuß, E. (Hrsg.) Gadamer's Lehrbuch der Chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte. Band I/2. Vandenhoeck und Rupprecht, Göttingen. S. 205 - 254, (1979)
5. Bachmann, E.W., Hofmann, A.A. und Waser, P.G., Identification of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in human plasma by gaschromatography. J. Chromatogr. 178, 320 - 323 (1979)
6. BAKER, BAKER-10 SPE column Conditioning, Beipackzettel der BAKER-10 SPE Säulen
7. BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS, Inc., Datenblatt zum Verfahren CANNABUSETM
8. Burstein, S., Rosenfeld, J. und Wittstruck, Th., Isolation and characterization of two major urinary metabolites of Delta-1-Tetrahydrocannabinol. Science 176, 422 - 423, (1972)
9. ElSohly, M.A., ElSayed, S.A. und Jones, A.B. Analysis of the major metabolite of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Urine. III. A GC/ECD Procedure. J. Analyt. Toxicol. 8, 7 - 9, (1984)

10. ElSohly, M.A., ElSohly, H.N., Jones, A.B., Dimson, P.A. und Wells, K.E.
Analysis of the major metabolite of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in urine. II. A HPLC Procedure
J. Analyt. Toxicol. 7, 262 - 264, (1983)
11. Foltz, R.L., McGinnis, K.M. und Chinn, D.M.
Quantitative measurement of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in physiological specimens using capillary column gas-chromatography negative ion chemical ionization mass-spectrometry. Biomed. Mass Spectrom 10, 316 - 323 (1983)
12. Gaoni, Y. und Mechoulam, R.
Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. J. Amer. Chem. Soc. 86, 1646 - 1647, (1964)
13. Garret, E.R., Hunt, C.A.
Physiochemical properties, solubility and protein binding of Delta-9-Tetrahydrocannabinol. J. Pharm. Sci. 63: 1056 - 1064, (1974)
14. Gerlach, D., in Cannabis heute (Hrsg. W. Feuerlein) Akad. Verlagsgesellsch. Wiesbaden, 31, (1980)
15. Green, D.E., Fu-Chan, C., Loeffler, K.O. und Kanter, S.L. in Vinson, J.A. (Editor), Cannabinoid Analysis in Physiological Fluids, Amer. Chem. Soc. Symposium Series 98, 93 - 103, (1979)
16. Hanke, M. und Megges, G., Routine-Nachweis des THC-Metaboliten 11-Nor-Delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carbonsäure in der forensischen Praxis, Z. Rechtsmed. 90, 105 - 108, (1983)
17. Hollister, L.E., Kanter, S.L., Board, R.D. und Green, D.E., Marijuana metabolites in urine of man. III. Unchanged Delta-9-Tetrahydrocannabinol, Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol. 8, No. 4, (1974)

18. Jones, A.B., ElSohly, H.N., ElSayed, S.A. und ElSohly, M.A., Analysis of the major metabolite of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in urine. IV. A comparison of five methods. J. Anal. Toxicol. 8, 249 - 251, (1984)
19. Joachimoglu, G., Kiburis, J. und Miras, C., Distribution and excretion of Tetrahydrocannabinol - ^{14}C in rats. Prakt. Akad. Athenon 42, 161 - 167, (1967)
20. Just, W.W., Werner, G., und Wiedmann, M.
Bestimmung von Delta-1- und Delta-1 (6)-Tetrahydrocannabinol in Blut, Urin und Speichel von Haschisch-Rauchern, Die Naturwissenschaften 59, 222, (1972)
21. Kaistha, K.K. und Tadrus, R., Semi-quantitative thin layer mass-screening detection of 11-nor-Delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine, J. Chromatogr. 237, 528 - 533, (1982)
22. Kanter, S.L., Hollister, L.E. und Moore, F.,
Marihuana metabolites in urine of man. V. Characterization and separation of polar metabolites of Delta-9-Tetrahydrocannabinol.
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol. 10, No. 2, (1974)
23. Kanter, S.L., Hollister, L.E., Moore, F. und Green, D.E.,
Marihuana metabolites in urine of man. IV. Extraction procedures using diethyl ether.
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol. 9, No. 2, (1974)
24. Kanter, S.L., Hollister, L.E., Moore, F. und Green, D.E.,
Marihuana metabolites in urine of man. II. Undescribed metabolite following oral ingestion of Delta-9-Tetrahydrocannabinol.
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol. 7, No. 1, (1974)
25. Kanter, S.L., Hollister, L.E. und Musumeci, M.
Marihuana metabolites in urine of man. X. Identification of Marihuana use by detection of Delta-9-Tetrahydrocannabinol-11-oic acid using thin layer chromatography.
J. Chromatogr. 234, 201 - 208, (1982)

26. Kanter, S.L., Hollister, L.E. und Zamora, J.U.,
Marihuana metabolites in urine of man. XI. Detection of
unconjugated and conjugated Delta-9-Tetrahydrocannabinol-
11-oic acid by thin layer chromatography
J. Chromatogr. 235, 507 - 512, (1982)
27. Kisser, W., Zum Nachweis von Haschischinhaltsstoffen im
Harn, Arch. Toxicol. 29, 331 - 334, (1972)
28. Kogan, M.J., Newman, E. und Willson, N.J.,
Detection of marihuana metabolite 11-nor-Delta-9-Tetra-
hydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by bon-
ded-phase absorption and thin layer chromatography
J. Chromatogr. 306, 441 - 443, (1984)
29. Law, B., Mason, P.A., Moffat, A.C., Gleadle, R.J. und
King, L.J., Forensic aspects of the metabolism and ex-
cretion of cannabinoids following oral ingestion of can-
nabis resin. J. Pharm. Pharmacol. 36, 289 - 294, (1984)
30. Law, B., Pocock, K. und Moffat, A.C.,
An evaluation of homogeneous Enzyme Immunoassay (EMIT)
for Cannabinoid detection in biological fluids
J. Forensic Sci. Soc. 22, 275 - 281, (1982)
31. Lemberger, L., Axelrod, J. und Kopin, I.J.,
Metabolism and disposition of Delta-9-Tetrahydrocannabi-
nol in man, J. Pharmacol. Reviews, Vol. 23, No. 4, 371 -
380, (1971)
32. Machata, G. und Krypsin-Exner, K., Nachweis von Haschisch
im Harn nach experimenteller Einnahme, Wiener Klinische
Wochenschrift 82, 849 - 852, (1970)
33. Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H. und Grunfeld, Y.,
The chemical basis of hashish activity, Science 169,
611 - 612, (1970)
34. von Meyer, L., Zum enzymatisch-immunochemischen Nachweis
des Haschischkonsums und seiner dünnschichtchromatogra-
phischen Absicherung, Z. Rechtsmedizin. 94, 219 - 225,
(1985)

35. Peat, U.A., Deyman, U.E. und Johnson, J.R.,
High performance liquid chromatography-immunoassay of
Delta-9-Tetrahydrocannabinol and its metabolites in urine
J. Forensic Sci. 29, 110 - 119, (1984)
36. Roesener, H.-U., pers. Mitteilung (1984)
37. Salaschek , M., Matte, A. und Seifert, R., Über die Pro-
blematik des Nachweises von Haschischgenuß durch dünn-
schichtchromatographische Urinuntersuchungen. J. Chroma-
togr. 78, 393 - 400, (1973)
38. Syva. Marijuana and the EMIT Cannabinoid assay (Final
Manuscript, preliminary edition, June 1981).
Syva Company, Medical Communications, June 1981
39. Tashkin, D.P., Cannabis 1977
Annales of Internal Medicine 89, 539, (1978)
40. Teale, J.D., Forman, E.J., King L.J. und Marks, V.,
Radioimmunoassay of Cannabinoids in blood and urine,
Lancet 2, 553 - 555 (1974)
41. Vinson, J.A. und Lopatofsky, D.J.,
A semi-automated extraction and spotting system for drug
analysis by TLC. I. Procedure for analysis of the major
metabolite of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in urine.
J. Anal. Toxicol. 9, 6 - 9, (1985)
42. Wall, M.E., Brine, D.R. und Perez-Rayez, M.,
Metabolism of Cannabinoids in man, Pharmacology of Mari-
huana, Vol. 1, 93 - 113, Brande, M.C., und Szara, S.
(Hrsg.), Raven Press (1976)
43. Whiting, J.D. und Manders, W.W.,
Confirmation of a Tetrahydrocannabinol metabolite in
urine by gaschromatography, J. Anal. Toxicol. 6, 49 - 52
(1982)
44. Whiting, J.D. und Manders, W.W.,
The confirmation of 9-Carboxy-THC in urine by Gaschroma-
tography/mass spectrometry, Aviat. Space Environ Med. 54,
1031 - 1033, (1983)
45. Willson, N.J., Kogan, M.J., Pierson, D.J. und Newman, E.,
Confirmation of EMIT cannabinoid assay results by bonded
phase absorption with thin layer chromatography, J. Toxi-
col.-Clin., Toxicol. 20, 465 - 473, (1983)

10. LEBENSLAUF

=====

17. November 1950	Geboren in Bad Aibling/Obb. Vater: Dr.med.dent. Friedrich Hefeke, Zahnarzt (verstorben im Januar 1963) Mutter: Mathilde Hefeke, geb. Mayer
1957 - 1961	Besuch der Volksschule Kolbermoor
1961 - 1972	Besuch des Ignaz-Günther-Gymnasiums in Rosenheim
23. Juni 1972	Abitur
Sept.1972 - Okt.1973	verschiedene Tätigkeiten (zahntech- nisches Labor, Post)
Nov. 1973 - Okt.1974	Studium der Mathematik und Physik an der LMU München
Nov. 1974 - Dez.1976	Tätigkeit in einem zahntechnischen Labor
Jan. 1977 -Sept.1977	Freischaffende künstlerische Tätigkeit
Okt. 1977 -Juni 1986	Tätigkeit in der Flugzeugabfertigung am Flughafen München-Riem (von Nov. 1978 - Juni 1986 als Teilzeitbeschäft- tigung)
WS 1978/79 -	Studium der Zahnheilkunde an der LMU
WS 1983/84	München
12. März 1984 -	Staatsexamen im Fach Zahnheilkunde
27. September 1984	
16. November 1984	Approbation zum Zahnarzt, Bay. Staats- ministerium des Inneren, München
ab Januar 1985 -	Doktorand bei Prof. Dr. W. Spann und
Juni 1986	Priv.-Doz. Dr. Ludwig von Meyer am Institut für Rechtsmedizin der LMU München
ab 1. Juli 1986	Aufnahme einer Tätigkeit als As- sistenz Zahnarzt

